



---

seit 1558

**Entwicklung und Anwendung eines NIRS-basierten  
Routineverfahrens zur Analyse der relativen und absoluten  
Fettsäurezusammensetzung in Rind- und Schweinefleisch  
sowie  
die Untersuchung von Kandidatengeneten für den bovinen  
Fettstoffwechsel**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl. troph. **Susanne Kämmerer**  
geboren am 07.07.1980 in Suhl

Tag der Verteidigung: 14.12.2009

- |               |                                       |
|---------------|---------------------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Bernd Luckas (FSU Jena)     |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Stefan Lorkowski (FSU Jena) |
| 3. Gutachter: | PD Dr. Christa Kühn (FBN Dummerstorf) |

# INHALTSVERZEICHNIS

<i>Abbildungsverzeichnis .....</i>	<i>I</i>
<i>Tabellenverzeichnis .....</i>	<i>II</i>
<i>Abkürzungen .....</i>	<i>IV</i>
<b>1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2 TEIL I: ENTWICKLUNG EINES NIRS-VERFAHRENS ZUR BESTIMMUNG VON FETTSÄUREN IN RIND- UND SCHWEINEFLEISCH .....</b>	<b>6</b>
2.1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER NIR-SPEKTROSKOPIE .....	7
2.1.1 FUNKTIONSPRINZIP NIRS .....	7
2.1.1.1 Physikalisch-chemische Grundlagen.....	7
2.1.1.2 Funktionsweise des NIR-Spektrometers .....	8
2.1.2 KALIBRATIONSENTWICKLUNG .....	11
2.1.2.1 Ablauf .....	11
2.1.2.2 Spektrentransformation.....	13
2.1.2.3 Kriterien zur Beurteilung einer Kalibration .....	16
2.2 MATERIAL UND METHODEN .....	20
2.2.1 TIERE.....	20
2.2.1.1 Rinder .....	20
2.2.1.2 Schweine .....	21
2.2.2 PROBENVORBEREITUNG .....	22
2.2.3 FETTSÄUREANALYTIK .....	23
2.2.3.1 Lipidextraktion.....	23
2.2.3.2 Derivatisierung.....	24
2.2.3.3 Gaschromatographie .....	24
2.2.3.4 Berechnung des Laborfehlers (SEL) .....	25
2.2.4 NAHINFRAROTSPEKTROSKOPIE .....	26
2.2.4.1 Messungen .....	26
2.2.4.2 Datensätze.....	26
2.2.4.3 Kalibrierung.....	28
2.3 ERGEBNISSE .....	31

2.3.1	NIRS-KALIBRIERUNGEN FÜR RINDFLEISCH .....	31
2.3.1.1	NIRS-Kalibrierungen für relative Fettsäureparameter.....	31
2.3.1.2	NIRS-Kalibrierungen für absolute Fettsäureparameter.....	35
2.3.2	NIRS-KALIBRIERUNGEN FÜR SCHWEINEFLEISCH.....	38
2.3.2.1	NIRS-Kalibrierungen für relative Fettsäureparameter.....	38
2.3.2.2	NIRS-Kalibrierungen für absolute Fettsäureparameter.....	41
2.4	DISKUSSION.....	45
<b>3</b>	<b>TEIL II: ANWENDUNG DES NIRS-VERFAHRENS – SCHÄTZUNG VON GENETISCHEN PARAMETERN UND ZUCHTWERTEN ANHAND VON NIRS- DATEN FÜR DIE IDENTIFIZIERUNG VON INDIVIDUEN MIT EXTREMER GENETISCHER VERANLAGUNG .....</b>	<b>53</b>
3.1	HINTERGUND.....	53
3.2	MATERIAL UND METHODEN.....	56
3.2.1	VARIANZKOMPONENTENSCHÄTZUNG .....	56
3.2.2	ZUCHTWERTSCHÄTZUNG .....	58
3.2.3	STATISTISCHE AUSWERTUNG .....	58
3.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION .....	59
3.3.1	HERITABILITÄTEN UND KORRELATIONEN IN DER SPEZIES RIND.....	59
3.3.2	HERITABILITÄTEN UND KORRELATIONEN IN DER SPEZIES SCHWEIN .....	63
3.3.3	IDENTIFIZIERUNG VON INDIVIDUEN MIT EXTREMER GENETISCHER VERANLAGUNG .....	68
<b>4</b>	<b>TEIL III: UNTERSUCHUNG VON KANDIDATENGGENEN FÜR DEN BOVINEN FETTSTOFFWECHSEL.....</b>	<b>70</b>
4.1	KANDIDATENGGENE.....	70
4.1.1	ACAD9.....	70
4.1.2	DGAT1 .....	72
4.1.3	FASN .....	73
4.1.4	PPARGC1A.....	74
4.1.5	SCD1 .....	75
4.1.6	TG.....	76
4.2	MATERIAL UND METHODEN.....	78
4.2.1	TIERE.....	78
4.2.2	PROBENVORBEREITUNG – DNA-ISOLATION AUS BLUT .....	78
4.2.3	MOLEKULARGENETISCHE TECHNIKEN.....	79

4.2.3.1	PCR .....	79
4.2.3.2	Sequenzierung.....	80
4.2.3.3	Methoden zur Typisierung.....	81
4.2.4	STATISTISCHE AUSWERTUNG.....	84
4.3	ERGEBNISSE .....	85
4.3.1	SEQUENZIERUNG .....	85
4.3.2	TYPISIERUNG .....	87
4.4	DISKUSSION.....	89
<b>5</b>	<b>ABSCHLUSSBETRACHTUNG .....</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY .....</b>	<b>97</b>
	<i>Literaturverzeichnis.....</i>	<i>VI</i>
	<i>Anhang .....</i>	<i>XVI</i>

# ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1-1:</b>	Arbeitspaketstruktur des QuaLIPID-Projektes (Die Pfeile symbolisieren Informations- oder Datenfluss. Das eingeklammerte Arbeitspaket wäre als Teil eines Folgeprojektes denkbar [modifiziert nach FRIES 2005]).....	3
<b>Abb. 2-1:</b>	<i>Foss</i> NIR-Spektrometer Modell 6500 mit Spinning Sample Modul.....	6
<b>Abb. 2-2:</b>	Schwingungsarten von Molekülbindungen am Beispiel der Methylengruppe –CH <sub>2</sub> [nach Foss 2007, MURRAY 2003].....	7
<b>Abb. 2-3:</b>	Beispiele für Absorptionsbanden im Nahinfrarot [modifiziert nach MURRAY 2003]. .....	8
<b>Abb. 2-4:</b>	Schematischer Aufbau eines Monochromators [modifiziert nach FOSS 2005]. .....	9
<b>Abb. 2-5:</b>	Reflexions-Detektor [modifiziert nach FOSS 2005].....	10
<b>Abb. 2-6:</b>	VIS-NIR-Spektren unterschiedlicher Matrices.....	10
<b>Abb. 2-7:</b>	Kalibrierung und Validierung in der Nahinfrarotspektroskopie.....	12
<b>Abb. 2-8:</b>	Streulichtkorrektur SNV+DT am Beispiel von Rindfleischspektren (n = 95) Spektren im Original (links) und nach Transformation (rechts).....	14
<b>Abb. 2-9:</b>	Ableitungen von Spektren am Beispiel von Rindfleischproben (n = 95). .....	15
<b>Abb. 2-10:</b>	Graphische Darstellung von Kalibrierung (n = 96) und Validierung (n = 36) am Beispiel des Palimitinsäuregehaltes in Rindfleisch.....	19
<b>Abb. 2-11:</b>	Zusammensetzung des Futters in der Schweinemast.....	22
<b>Abb. 4-1:</b>	Dehydrogenierung von Acyl-CoA zu <i>trans</i> -2-Enoyl-CoA durch ACAD9 [nach VOET et al. 2002].....	71
<b>Abb. 4-2:</b>	Synthese von Triacylglycerol (Triglycerid): Übertragung eines Acylrestes auf Diacylglycerol durch DGAT [nach VOET et al. 2002].....	72
<b>Abb. 4-3:</b>	Desaturierung von Stearoyl-CoA durch SCD .....	75
<b>Abb. 4-4:</b>	RFLP-Systeme für die Typisierung von SNPs in <i>ACAD9</i> , <i>DGAT1</i> , <i>FASN</i> und <i>TG</i> .....	82
<b>Abb. 4-5:</b>	Typisierung von SNPs in <i>ACAD9</i> , <i>PPARGC1A</i> und <i>SCD1</i> nach dem tetra-primer ARMS-PCR-Verfahren .....	83

# TABELLENVERZEICHNIS

<b>Tab. 2-2:</b>	Richtlinien für die Interpretation von $R^2$ [modifiziert nach WILLIAMS 2004] .....	17
<b>Tab. 2-3:</b>	Futterplan für die Bullenmast .....	21
<b>Tab. 2-4:</b>	Vorbehandlungen der Spektren für die Auswahl der Kalibrierproben .....	27
<b>Tab. 2-5:</b>	relative Fettsäurezusammensetzung (% FAME) von Rindfleisch ( <i>M. long. dorsi</i> ) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung .....	33
<b>Tab. 2-6:</b>	Kalibrationsstatistik für relative Fettsäureparameter in Rindfleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-5) .....	34
<b>Tab. 2-7:</b>	absolute Fettsäurezusammensetzung (mg FS/100 g Fleisch) von Rindfleisch ( <i>M. long. dorsi</i> ) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung .....	36
<b>Tab. 2-8:</b>	Kalibrationsstatistik für absolute Fettsäureparameter in Rindfleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-7) .....	37
<b>Tab. 2-9:</b>	relative Fettsäurezusammensetzung (% FAME) von Schweinefleisch ( <i>M. long. dorsi</i> ) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung .....	39
<b>Tab. 2-10:</b>	Kalibrationsstatistik für relative Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-9) .....	40
<b>Tab. 2-11:</b>	absolute Fettsäurezusammensetzung (mg FS/100 g Fleisch) von Schweinefleisch ( <i>M. long. dorsi</i> ) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung .....	42
<b>Tab. 2-12:</b>	Kalibrationsstatistik für absolute Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-11) .....	43
<b>Tab. 2-13:</b>	Übersicht der mit NIRS in Rind- und Schweinefleisch bestimmbaren Fettsäureparameter .....	44
<b>Tab. 3-1:</b>	Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen relativer Fettsäureparameter in Rindfleisch .....	61
<b>Tab. 3-2:</b>	Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen absoluter Fettsäureparameter in Rindfleisch .....	62
<b>Tab. 3-3:</b>	Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen relativer Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Mutterrassen) .....	64
<b>Tab. 3-4:</b>	Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen absoluter Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Mutterrassen) .....	65
<b>Tab. 3-5:</b>	Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und	

	phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen relativer Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Vaterrasse).....	66
<b>Tab. 3-6:</b>	Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen absoluter Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Vaterrasse).....	67
<b>Tab. 3-7:</b>	Merkmalsausprägungen in den Bullengruppen.....	69
<b>Tab. 4-1:</b>	Pipettierschema PCR (1-fach, Endvolumen: 10 µl) .....	80
<b>Tab. 4-2:</b>	PCR-Bedingungen (30 Zyklen der Schritte 2 - 4) .....	80
<b>Tab. 4-3:</b>	Pipettierschema für den Restriktionsverdau.....	82
<b>Tab. 4-4:</b>	Primervolumina für die tetra-primer ARMS-PCR.....	83
<b>Tab. 4-5:</b>	Sequenzierung von SNPs in Individuen mit extremen $EBV_{IMF}$ und DNA-Pools (in gepoolter DNA höhere Präsenz des fett geschriebenen Allels) .....	86
<b>Tab. 4-6:</b>	Genotypenfrequenzen in den Bullengruppen .....	88



## ABKÜRZUNGEN

1-VR	<i>1 minus variance ratio</i> (dt. Bestimmtheitsmaß der Kreuzvalidierung)
ACAD	Acyl-CoA-Dehydrogenase
ARMS	<i>amplification refractory mutation system</i> (dt. allelspezifische Amplifikation)
BHT	Butylhydroxytoluol; 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol
bp	Basenpaare
CLA	<i>conjugated linoleic acid</i> (dt. konjugierte Linolsäure)
DGAT	Diacylglycerol-O-Acyltransferase
EBV	<i>estimated breeding value</i> (dt. Zuchtwert)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FAME	<i>fatty acid methyl ester</i> (dt. Fettsäuremethylester)
FASN	Fettsäuresynthase
GC	Gaschromatograph
kbp	1 Kilo-Basenpaare = 1.000 Basenpaare
Mbp	1 Mega-Basenpaare = 10 <sup>6</sup> Basenpaare
ME	Methylester
MUFA	<i>monounsaturated fatty acids</i> (dt. einfach ungesättigte Fettsäuren)
MW	Mittelwert
n-3	omega-3 bzw. $\omega$ 3 (Bezeichnung für eine Fettsäurefamilie, die sich durch das Vorkommen der ersten Doppelbindung am 3. C-Atom - vom Methylende gezählt - auszeichnet)
n-6	omega-6 bzw. $\omega$ 6 (Bezeichnung für eine Fettsäurefamilie, die sich durch das Vorkommen der ersten Doppelbindung am 6. C-Atom - vom Methylende gezählt - auszeichnet)
NIRS	Nahinfrarotspektroskopie
NKP	Nachkommenprüfung
PCR	<i>principle component regression</i> oder <i>polymerase chain reaction</i> (dt. Polymerasekettenreaktion)
PPARGC1A	<i>peroxisome proliferator-activated receptor-<math>\gamma</math> coactivator 1<math>\alpha</math></i>
PUFA	<i>polyunsaturated fatty acids</i> (dt. mehrfach ungesättigte Fettsäuren)
QTL	<i>quantitative trait locus</i>
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (dt. Restriktionsfragment-längenpolymorphismus)
RPD	<i>residual predictive value</i>
rpm	<i>rotations per minute</i> (dt. Umdrehungen pro Minute)
RSQ	<i>r square</i> (dt. Bestimmtheitsmaß)

SCD	Stearoyl-CoA-Desaturase
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate solution</i> (dt. Natriumdodecylsulfatlösung)
SEC	<i>standard error of calibration</i> (dt. Standardfehler der Kalibrierung)
SECV	<i>standard error of crossvalidation</i> (dt. Standardfehler der Kreuzvalidierung)
SEL	<i>standard error of laboratory</i> (dt. Laborfehler - Standardfehler wiederholter Laboruntersuchungen)
SEP	<i>standard error of prediction</i> (dt. Standardfehler der Analyse)
SFA	<i>saturated fatty acids</i> (dt. gesättigte Fettsäuren)
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> (dt. Einzelbasenpolymorphismus)
TBME	tert-Butylmethylether
TE	Tris-EDTA-Puffer
TMSH	Trimethylsulfoniumhydroxid
TG	Thyroglobulin

### **Basen-Nomenklatur in Nukleinsäuresequenzen [NC-IUB 1985]**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
K	Guanin oder Thymin
M	Adenin oder Cytosin
R	Adenin oder Guanin
S	Guanin oder Cytosin
W	Adenin oder Thymin
Y	Thymin oder Cytosin

# 1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Fleisch und daraus hergestellte Erzeugnisse sind in Deutschland beliebte Lebensmittel. Männer nehmen durchschnittlich 103 g/d zu sich, Frauen etwa halb so viel [MRI 2008]<sup>1</sup>. Auf Grund des regelmässigen Verzehrs und des teilweise hohen Fettgehaltes der verarbeiteten Produkte trägt diese Lebensmittelgruppe wesentlich zur Deckung (und Überschreitung) des Energiebedarfes bei und stellt eine der Hauptquellen für die Fettaufnahme in der menschlichen Ernährung dar [MRI 2008, HULSHOF et al. 1999].

Das Fett in Lebensmitteln tierischer Herkunft weist einen relativ hohen Anteil gesättigter Fettsäuren (SFA) auf. Die Zufuhr von Fett in Form von Fleisch und Fleischprodukten geht folglich mit einer gesteigerten Aufnahme gesättigter Fettsäuren einher. In Deutschland gehören Fleisch und daraus hergestellte Erzeugnisse mit zu den Hauptquellen für SFA in der menschlichen Ernährung [HULSHOF et al. 1999].

Der Verzehr von gesättigten Fettsäuren ist nachweislich mit einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Dyslipoproteinämie und koronarer Herzkrankheit (KHK) assoziiert [DGE 2006]. Dies hat zur Folge, dass der regelmäßige Konsum von Fleisch und Fleischerzeugnissen als Risikofaktor für die Entstehung ernährungsmitbedingter Krankheiten gilt und eine Einschränkung des Verzehrs von Lebensmitteln dieser Kategorie zugunsten von pflanzlichen Lebensmitteln und Seefisch empfohlen wird. Über die beiden letztgenannten Lebensmittelgruppen ist eine Erhöhung des Anteils von essentiellen Fettsäuren in der menschlichen Ernährung möglich, denen die Verringerung des Risikos für ernährungsmitbedingte Krankheiten zugeschrieben wird. Vor allem langkettige n-3 Fettsäuren senken mit überzeugender Evidenz das Risiko für Dyslipoproteinämie, Hypertonie und KHK [DGE 2006].

Das zunehmende Gesundheitsbewusstsein der Bevölkerung und der gestiegene Anspruch an die Produktqualität seitens der Verbraucher machen ein Umdenken bei der Erzeugung des Lebensmittels Fleisch erforderlich. Neben einem geringen Fettgehalt wird eine für den Menschen gesündere Fettzusammensetzung gewünscht, bei gleichzeitig

---

<sup>1</sup> Diese Daten berücksichtigen noch nicht die Menge an verzehrten „Gerichten auf Basis von Fleisch“. Bei Männern wurde für Lebensmittel dieser Kategorie eine tägliche Zufuhr von 57 g/d ermittelt, bei Frauen lag der Verzehr bei 30 g/d [MRI 2008].

hoher Genussqualität (Geschmack, Konsistenz). Dem Kritikpunkt des (zu) hohen Fettgehaltes wurde mit züchterischen Massnahmen, Änderungen von Haltungsbedingungen und Fütterung sowie der Senkung des Schlachalters der Tiere begegnet. Diese Massnahmen resultierten in dem gegenwärtig auf dem Markt erhältlichen Produkt Fleisch, das sich durch einen geringen Fettgehalt von durchschnittlich 1,90 g/100 g bei Rindfleisch und 1,86 g/100 g bei Schweinefleisch (reines Muskelfleisch) auszeichnet [DFAL 2008].

Die Forderung nach der Optimierung der Zusammensetzung des Fettes im Fleisch stellt die Forschung auf den Gebieten der Tierzucht und Tierernährung vor neue Herausforderungen. Ein züchterischer Ansatz oder die Strategie der Genotyp-abhängigen Haltung und Fütterung sind jedoch erst anwendbar, wenn entsprechende Informationen über die genetischen Grundlagen des Fettstoffwechsels bei Rind und Schwein vorliegen. Um die Voraussetzung für eine aussichtsreiche Bearbeitung der Problematik „Fettqualität“ zu schaffen, wurde im Rahmen der Fördermaßnahme FUGATO (funktionelle Genomanalyse im tierischen Organismus) das Verbundprojekt QuaLIPID initiiert.

Im Projekt QuaLIPID sollen Gene, die im Fettstoffwechsel von Rind und Schwein eine Rolle spielen, funktionell untersucht werden. Das Ziel ist die Identifizierung von DNA-Varianten, die für die Qualität tierischer Produkte (ernährungsphysiologischer Wert, sensorische Eigenschaften, Verarbeitungseignung) von Bedeutung sind.

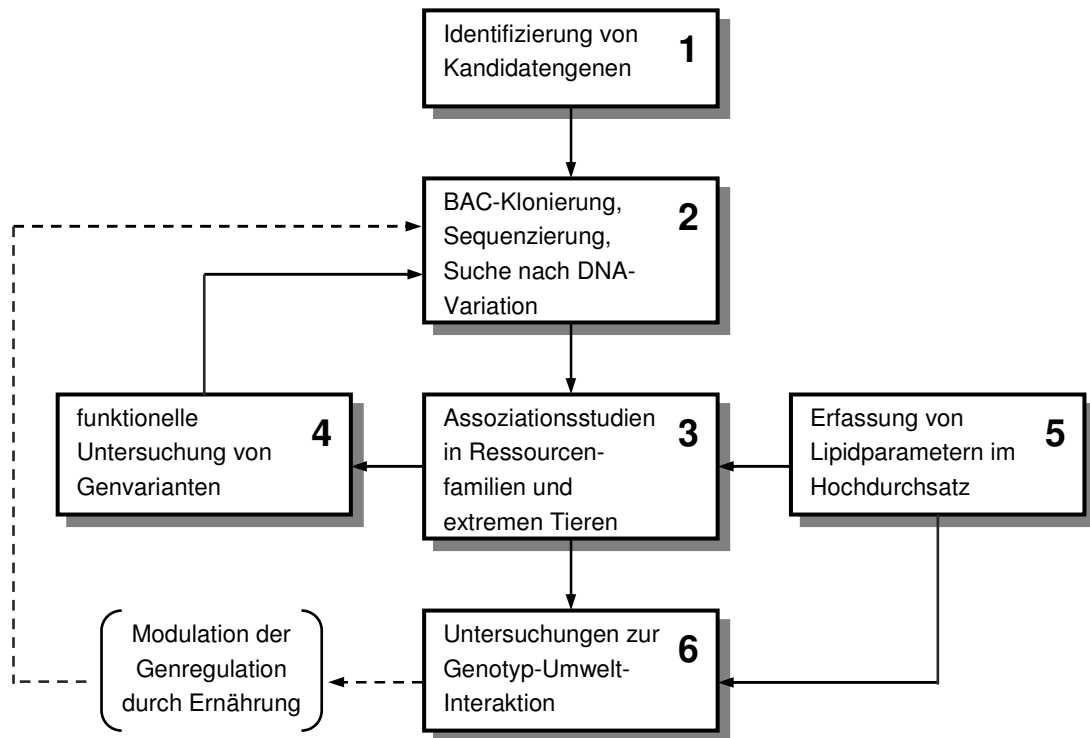
Das Verbundprojekt ist in 6 Arbeitspakete gegliedert (Abb. 1-1). Im ersten Arbeitspaket erfolgt die Identifizierung von Kandidatengenen über die Analyse relevanter Stoffwechselwege und unter Einbeziehung von Daten aus Genexpressionsstudien. Wichtige Gene, d.h. Gene, deren Produkte ratenlimitierende Funktion aufweisen oder Gene, die in einem QTL (*quantitative trait locus*) liegen, werden im Arbeitspaket 2 in BACs (*bacterial artificial chromosomes*) kloniert und sequenziert. In den resultierenden Sequenzen wird nach DNA-Variation gesucht. Studien zur Assoziation von identifizierten Genvarianten und Lipidparametern werden im Rahmen des Arbeitspaketes 3 durchgeführt. Die Untersuchungen erfolgen in Ressourcenfamilien und an Tieren mit extremen Zuchtwerten.

Die funktionelle Identifizierung von Kandidatengenen findet im Arbeitspaket 4 statt. In Tieren mit bekannten Genotypen werden Expressionsstudien basierend auf Microarray-Analysen durchgeführt.

Im Arbeitspaket 5 werden mittels Gaschromatographie (GC), Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) und Massenspektrometrie (MS) möglichst zahlreiche Lipidparameter im Hochdurchsatz erfasst. Aus dem umfangreichen Pool phänotypisch charakterisierter Tiere können dann – basierend auf Varianzkomponenten- und Zuchtwertschätzung – die

Individuen mit extremen Zuchtwerten für Assoziationsstudien selektiert werden.

Das Arbeitspaket 6 umfasst Untersuchungen zur Interaktion zwischen Genotyp und Ernährungsumwelt am Beispiel des Diacylglycerol-O-Acyltransferase Gens (*DGAT1*).



**Abb. 1-1:** Arbeitspaketstruktur des QuaLIPID-Projektes (Die Pfeile symbolisieren Informations- oder Datenfluss. Das eingeklammerte Arbeitspaket wäre als Teil eines Folgeprojektes denkbar [modifiziert nach FRIES 2005]).

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des Projektes QuaLIPID an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft (LfL) angefertigt. Die Aufgaben des Projektpartners LfL waren in die Arbeitspakete 3 und 5 eingegliedert. Für die vorliegende Arbeit ergaben sich somit folgende Zielsetzungen:

- Entwicklung eines Verfahrens zur Erfassung von Fettsäureparametern in Fleisch im Hochdurchsatz (Arbeitspaket 5).

Das Standardverfahren in der Fettsäureanalytik ist die Gaschromatographie. Nachteile dieses präzisen Verfahrens sind der relativ hohe Arbeitsaufwand und die damit verbundene Zeitintensität sowie der Einsatz von gesundheitsschädlichen

und giftigen Chemikalien.

Um die für das Projekt erforderliche, umfangreiche Erhebung phänotypischer Daten realisieren zu können, sollte ein auf Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) basierendes Hochdurchsatzverfahren entwickelt werden. Messungen mit einem NIR-Spektrometer sind schnell, benötigen keine aufwändige Probenvorbereitung und kommen ohne den Einsatz von Chemikalien aus. Bisher wurden an der LfL die Parameter Fett, Wasser, Protein und Asche im Fleisch routinemässig mit NIRS bestimmt. Mit dem neuen Verfahren sollte zusätzlich die Erfassung der relativen wie auch der absoluten Fettsäurezusammensetzung in Rind- und Schweinefleisch möglich sein.

- Schätzung genetischer Parameter und Identifizierung von Individuen mit extremer genetischer Veranlagung (Arbeitspaket 5).

Für die im Arbeitspaket 3 geplante Durchführung von Assoziationsstudien in Rind und Schwein war die Identifizierung von Tieren mit außergewöhnlicher genetischer Veranlagung notwendig. Es sollten Individuen selektiert werden, deren genetische Ausstattung eine extrem hohe bzw. niedrige Ausprägung von fettstoffwechselrelevanten Merkmalen begünstigt. Die beobachtete Ausprägung eines Merkmals (Phänotyp) ist das Ergebnis des Zusammenwirkens von genetischer Veranlagung (Genotyp) und Umwelteinflüssen. Die in der Tierzucht etablierten Verfahren der Varianzkomponenten- und Zuchtwertschätzung ermöglichen bei ausreichender Informationsmenge eine Trennung dieser beiden Einflussgrößen. Ein Vergleich von Individuen, basierend auf deren geschätzten Zuchtwerten, erlaubt daher eine bessere genetische Differenzierung als ein Vergleich auf der Basis von Phänotypwerten alleine.

Um beurteilen zu können, für welche Parameter die Schätzung von Zuchtwerten für die Identifizierung genetisch extremer Individuen am zweckmäßigsten ist, sollten Varianzkomponentenschätzungen durchgeführt und Heritabilitäten, phänotypische und genetische Korrelationen der Merkmale ermittelt werden. Die Datengrundlage hierfür sollte das NIRS-Verfahren liefern. Die Rangierung der Tiere nach ihren Zuchtwerten sollte die Auswahl von Individuen für die Assoziationsstudien im Arbeitspaket 3 ermöglichen.

- Untersuchung von Kandidatengenen des bovinen Fettstoffwechsels in Tieren mit extremen Zuchtwerten (Arbeitspaket 3).

Die Zusammenhänge zwischen den in den Kandidatengenen identifizierten DNA-Variationen und den Lipidparametern galt es im Rahmen des Arbeitspaketes 3 zu

charakterisieren. In der vorliegenden Arbeit sollten Untersuchungen an Individuen der Spezies Rind mit der genetischen Veranlagung zur Ausprägung von fettstoffwechselbezogenen Merkmalen im extrem niedrigen bzw. hohen Bereich durchgeführt werden. Dafür waren die Tiere entsprechend ihrer Zuchtwerte rangiert worden. Die DNA von jeweils 10 Tieren mit extrem niedrigen bzw. hohen Zuchtwerten wurde gepoolt und zur Identifizierung von SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) vergleichend sequenziert. Ausgewählte SNPs wurden anschließend in jeweils 50 Tieren mit den höchsten bzw. niedrigsten Zuchtwerten typisiert und die Genotypenverteilung in diesen beiden Gruppen verglichen.

## 2 TEIL I: ENTWICKLUNG EINES NIRS-VERFAHRENS ZUR BESTIMMUNG VON FETTSÄUREN IN RIND- UND SCHWEINEFLEISCH

Die Fettsäurenanalytik ist, wie die meisten nasschemischen Verfahren, mit einem erheblichen Zeitaufwand, dem Einsatz von Chemikalien und der Zerstörung der Probe verbunden – Nachteile, die einer routinemäßigen Erfassung von Fettsäuren in vielen Einrichtungen entgegen stehen.

Die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) bietet dem gegenüber eine schnelle Technik ohne aufwändige Probenvorbereitung und ohne die Verwendung oftmals bedenklicher Chemikalien. Außerdem arbeitet diese Technik zerstörungsfrei, so dass das Probenmaterial nach der NIRS-Analyse für weitere Untersuchungen zur Verfügung steht. Ein weiterer großer Vorteil der Nahinfrarotspektroskopie liegt in der Möglichkeit, mehrere Parameter simultan in nur einem Analysengang zu erheben.

Im folgenden Kapitel soll die Frage geklärt werden, in wie weit die Erfassung der relativen und absoluten Fettsäurezusammensetzung in Rind- und Schweinefleisch mit NIRS möglich ist und ob sich der routinemäßige Einsatz dieses Verfahrens als Hochdurchsatzmethode realisieren lässt.

Die nachstehenden Ausführungen zum NIR-Spektrometer beziehen sich auf ein System mit Monochromator (NIR-Spektrometer 6500, *Foss*; Abb. 2-1) und Messungen im Reflexionsmodus. Geräte der neueren NIRS-Generation mit Dioden-Array-Technologie sowie Messungen in Transmission sind nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit.



**Abb. 2-1:**  
*Foss* NIR-Spektrometer Modell  
6500 mit Spinning Sample  
Modul.

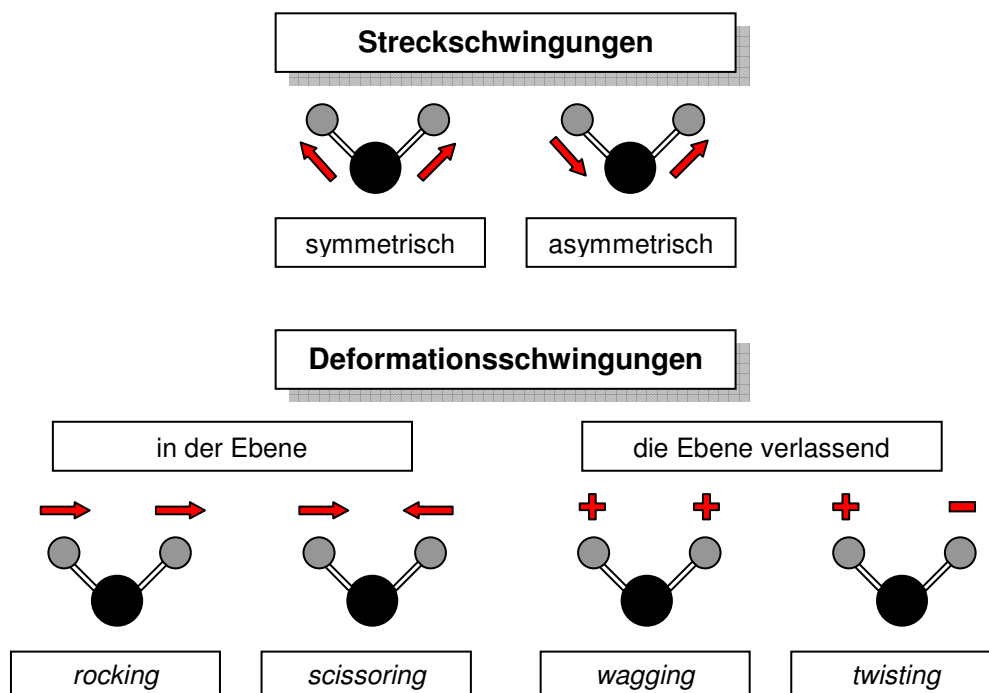


## 2.1 THEORETISCHE GRUNDLAGEN DER NIR-SPEKTROSKOPIE

### 2.1.1 FUNKTIONSPRINZIP NIRS

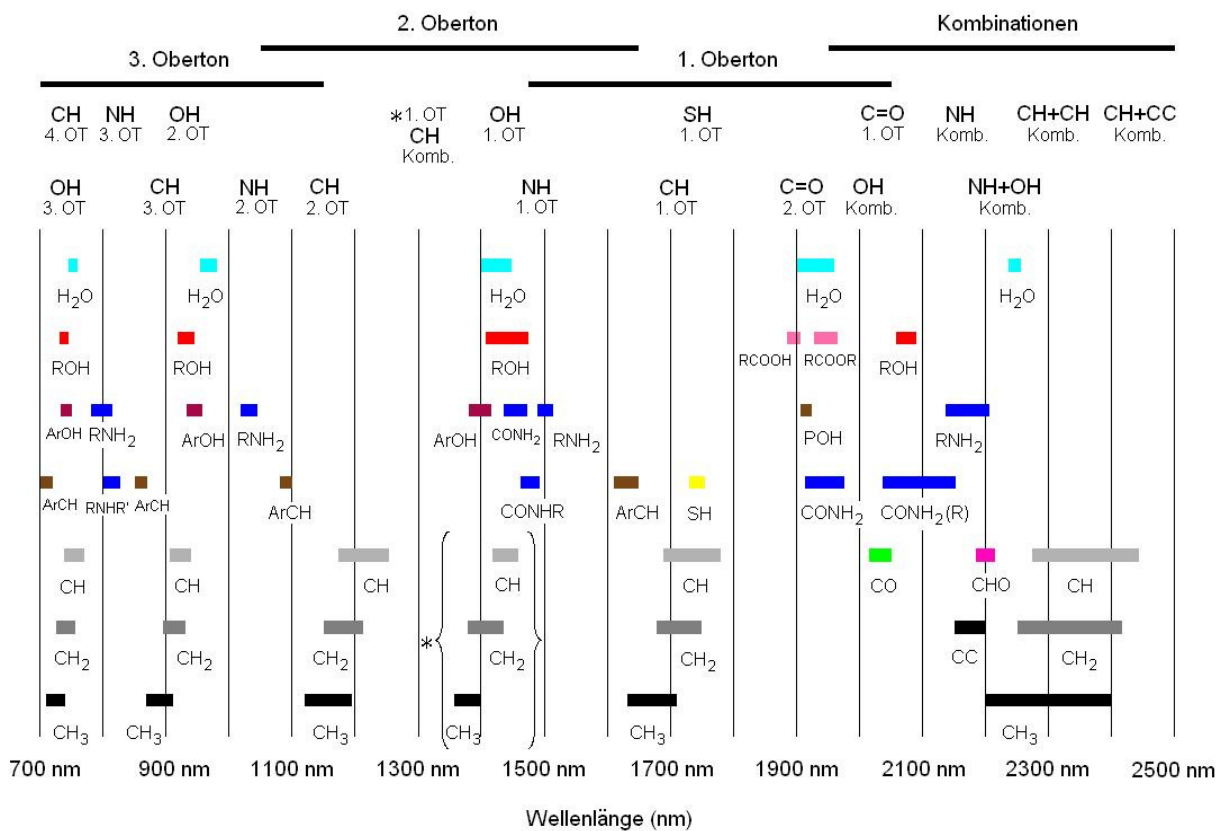
#### 2.1.1.1 Physikalisch-chemische Grundlagen

Die Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) beruht auf dem Phänomen der Absorption von Energie elektromagnetischer Strahlung durch kovalente Bindungen in Molekülen. Im nahinfraroten Spektralbereich (780 - 2500 nm) absorbieren vor allem Bindungen, an denen Wasserstoff-Atome beteiligt sind, wie in C-H, O-H oder N-H, spezifisch die Strahlungsenergie bestimmter Wellenlängen [BOKOBZA 1998, DAVIES 2005, SANDORFY et al. 2007]. Die nahinfrarote Strahlung regt dabei die Molekülbindungen zum Schwingen an. Die Schwingungen können mit einer Änderung in der Länge der Bindung einhergehen (Streckschwingung) oder den Winkel eine Bindung betreffen (Deformationsschwingung) (Abb. 2-2). Die Voraussetzung, dass ein Molekül infrarotaktiv ist, ist die Änderung des Dipolmomentes durch die Schwingung [MILLER 2004].



**Abb. 2-2:** Schwingungsarten von Molekülbindungen am Beispiel der Methylengruppe  $\text{-CH}_2$  [nach Foss 2007, MURRAY 2003].

Für bestimmte Gruppen von Atomen ergeben sich charakteristische NIR-Absorptionsbanden (Abb. 2-3). Die im nahen Infrarot auftretenden Schwingungen sind Obertöne und Kombinationen der Grundschnwingungen im mittleren Infrarot (Mid-IR) [DAVIES 2005, SANDORFY et al. 2007]. Aus diesem Grund können im nahen Infrarot mehrere Absorptionsbanden für eine Atomgruppierung bestehen (Obertöne der jeweiligen Grundschnwingung, Kombinationsschnwingungen). Oberton- und Kombinationschnwingungen sind wesentlich schwächer als die zugehörige Grundschnwingung [BOKOBZA 1998, MILLER 2004, SANDORFY et al. 2007]. Dies hat den Vorteil, dass in der Nahinfrarotspektroskopie keine Verdünnung des zu untersuchenden Materials notwendig ist, wie es oftmals Messungen im Mid-IR erfordern [MURRAY 2003].



**Abb. 2-3:** Beispiele für Absorptionsbanden im Nahinfrarot [modifiziert nach MURRAY 2003].

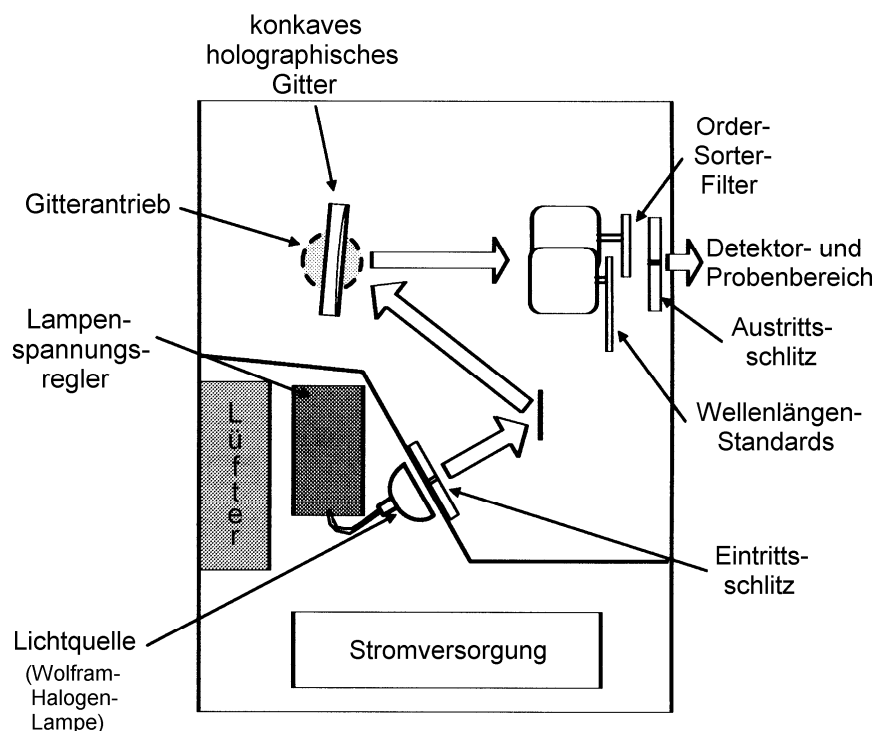
### 2.1.1.2 Funktionsweise des NIR-Spektrometers

Bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten NIR-Spektrometer Modell 6500 handelt es sich um ein Gerät mit scannendem Monochromator, womit neben dem nahinfraroten Spektralbereich (780 - 2500 nm, NIR) auch der sichtbare Bereich (400 - 780 nm, VIS) erfasst werden kann.

Im Monochromator erfolgt die Erzeugung von Strahlung einer bestimmten Wellenlänge

(Abb. 2-4). Als Strahlungsquelle dient eine Wolfram-Halogen-Glühlampe mit einem speziellen Reflektor. Die Aufspaltung der Strahlung in einzelne Wellenlängen erfolgt mit Hilfe eines beweglichen holographischen Gitters. Dabei entsteht Strahlung mit unterschiedlichen Beugungsordnungen. Diese Ordnungen überlappen teilweise, was zum Auftreten von unterschiedlichen Wellenlängen in der gleichen Position führt. In der Spektrophotometrie wird vorzugsweise Strahlung erster Ordnung verwendet, da diese die intensivste ist [FOSS 2005]. Mit einem Breitband-Filter (Order-Sorter-Filter) wird Strahlung aller anderen Ordnungen herausgefiltert, so dass ausschließlich monochromatische Strahlung erster Beugungsordnung durch den Austrittsschlitz auf die Probe trifft.

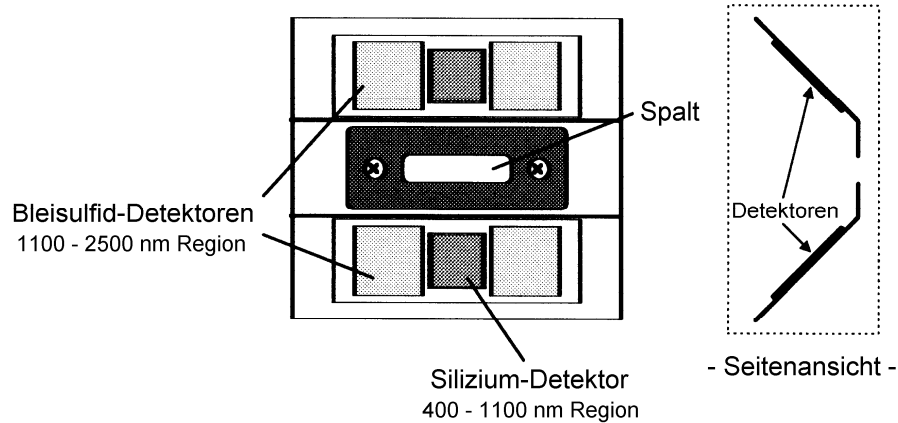
Für eine dauerhafte Genauigkeit und Präzision der Wellenlänge erfolgt eine Standardisierung mit Hilfe interner Referenzstandards (Wellenlängen-Linearisierung). Die vom Modell 6500 erzeugte monochromatische Strahlung erstreckt sich von 400 bis 2500 nm in 2 nm-Abständen.



**Abb. 2-4:** Schematischer Aufbau eines Monochromators  
[modifiziert nach FOSS 2005].

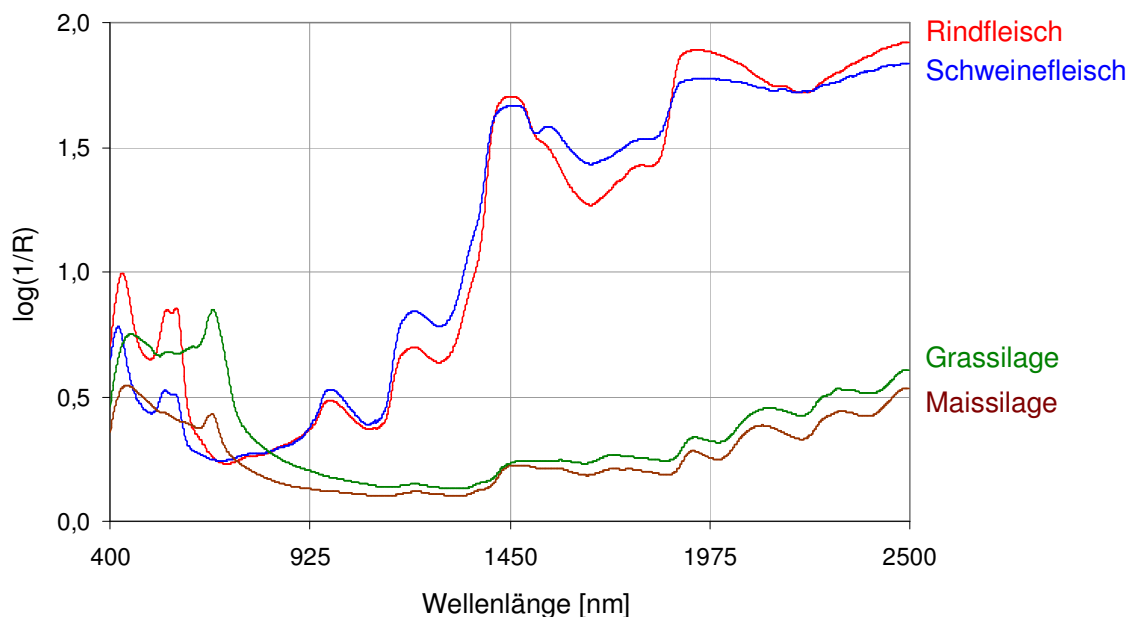
Das in der vorliegenden Arbeit verwendete NIR-Gerät ist mit einem Reflexionsdetektor ausgerüstet. Da die monochromatische Strahlung senkrecht auf die Probenoberfläche trifft, sind die Detektor-Elemente im Winkel von  $45^\circ$  zur Probenoberfläche angebracht, um die vom Messzellenfenster gespiegelte Strahlung zu umgehen und ausschließlich die von der Probenoberfläche diffus reflektierte Strahlung aufzufangen.

Um den Auffangbereich zu vergrößern und die Signale zu verstärken werden multiple Detektoren eingesetzt [FOSS 2005]. Das Detektor-Modul des verwendeten Modell 6500 besteht aus zwei Silizium-Detektoren zur Erfassung des Wellenlängenbereiches von 400 bis 1098 nm und vier Bleisulfid-Detektoren für den Wellenlängenbereich von 1100 bis 2500 nm (Abb. 2-5).



**Abb. 2-5:** Reflexions-Detektor [modifiziert nach FOSS 2005].

Bevor eine Probe gescannt wird, erfolgt die Messung einer geräteinternen Referenzscheibe aus Keramik, deren Reflexionsgrad 100 % beträgt. Von diesem Referenzspektrum wird die Reflexion der Probe subtrahiert. Die Differenz entspricht der Absorption  $\log(1/R)$ . Je nach der Zusammensetzung der Probe ergibt sich ein charakteristisches Spektrum (Abb. 2-6).



**Abb. 2-6:** VIS-NIR-Spektren unterschiedlicher Matrices.

Die in Abbildung 2-6 dargestellten Spektren der Futtermittel basieren auf Messungen von getrocknetem Probenmaterial, die Fleischproben wurden in frischem Zustand vermessen. Der unterschiedliche Feuchtigkeitsgehalt wird besonders deutlich im Bereich um 1450 nm und 1930 nm. Hier liegen die breiten Absorptionsbanden des wichtigsten Absorbers in der Nahinfrarotspektroskopie: dem Wassermolekül [BÜNING-PFAUE 2003, TILLMANN 2006]. Gemäß dem Lambert-Beerschen-Gesetz ist das Ausmaß der Absorption (Peakhöhe) proportional zur Menge des absorbierenden Inhaltsstoffes [FOSS 2007, TILLMANN 2006]. In Abbildung 2-6 wird dieser Zusammenhang anhand der Wasserbanden deutlich: Die feuchten Fleischproben weisen in den Bereichen um 1450 nm und 1930 nm wesentlich höhere Peaks auf als die trockenen Futtermittel.

## 2.1.2 KALIBRATIONSENTWICKLUNG

Im Vergleich zu chemischen Analysemethoden zeichnet sich die Nahinfrarotspektroskopie vor allem durch ihre Schnelligkeit und die Möglichkeit der simultanen Erfassung mehrerer Parameter aus. Um diese Vorteile nutzen zu können, ist vorab die Kalibrierung des Spektrometers erforderlich. Dafür werden von ausgewählten Proben sowohl NIR-Spektren aufgenommen als auch der gewünschte Parameter über eine Referenzmethode bestimmt. Mit Hilfe chemometrischer Techniken können dann mathematische Beziehungen zwischen der Variation in den Spektren und der Variation des Parameters entwickelt werden. Diese Beziehungen lassen sich anschließend nutzen, um Parameterwerte in unbekannten Proben vorherzusagen [FOSS AND ISI 2006].

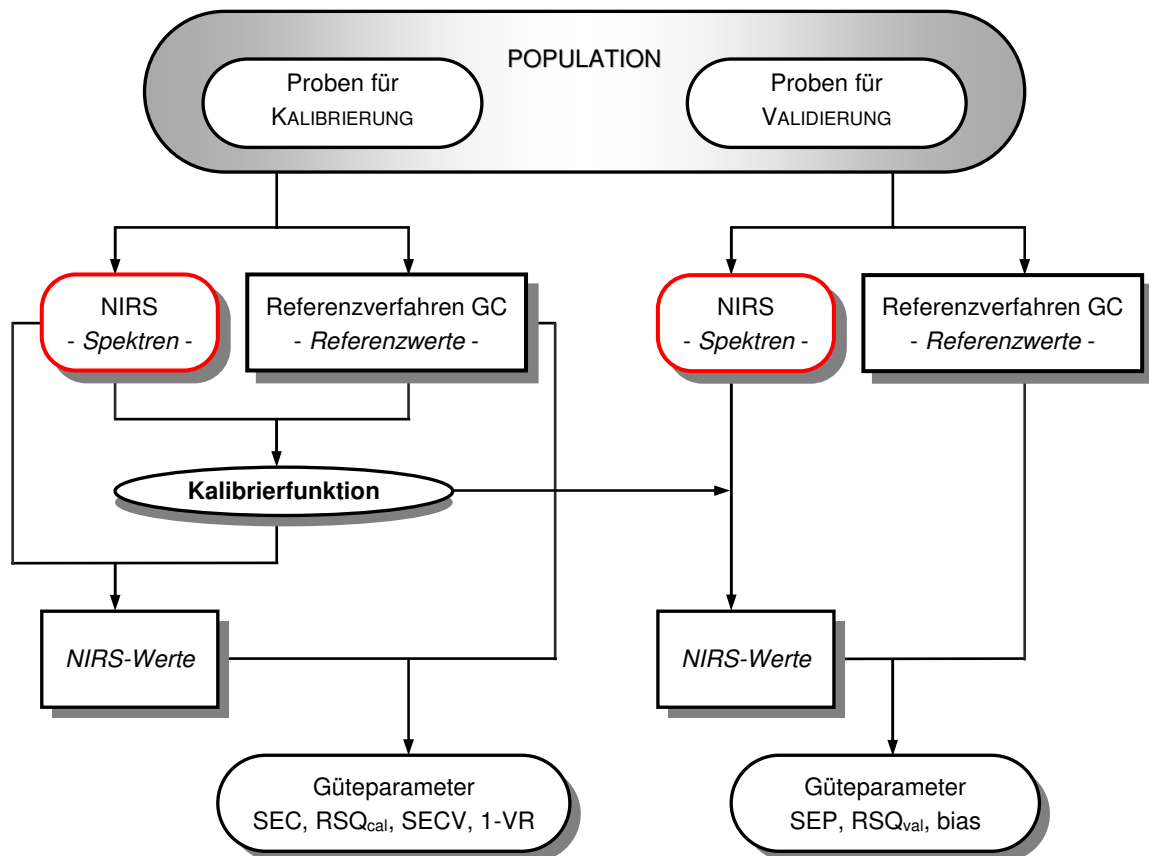
### 2.1.2.1 Ablauf

Der zentrale Schritt bei der Entwicklung einer NIRS-Kalibrierung ist die Erstellung einer **Kalibrierfunktion** (Abb. 2-7). Hierfür werden von Kalibrierproben (Cal-Set) sowohl die NIR-Spektren erfasst als auch der zu kalibrierende Parameter referenzmethodisch bestimmt. Dabei sollte das Kalibrierproben-Set die zukünftig zu messende Probenvielfalt widerspiegeln. Im Idealfall enthält ein repräsentatives Cal-Set alle Ausprägungen der probenspezifischen Merkmale (wie z.B. Inhaltsstoffgehalte, Partikelgröße, Herkunft, Jahrgang, etc.) in gleicher Anzahl [FOSS 2007, TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004]. Als Richtwert für den Umfang des Cal-Sets für die Entwicklung einer stabilen Kalibrierung ist bei FOSS [2007] ein Minimum von 80 Proben angegeben.

Der Zusammenhang zwischen spektraler Information und referenzmethodisch bestimmten

Parameterwerten wird mit Hilfe mathematischer Algorithmen erfasst. Das dafür heute in der Nahinfrarotspektroskopie vorherrschende Verfahren ist die Methode der partiellen kleinsten Quadrate (partial least squares, **PLS**) [FOSS 2007, TILLMANN 2006]. Im Rahmen der PLS-Regression erfolgt die Reduktion der komplexen spektralen Information auf wenige, unkorrelierte Faktoren (Hauptkomponenten / *principal components* / *scores* / *terms*). Dabei werden Wellenlängen, die hochkorreliert sind, zu einem Faktor zusammengefasst. Auch spektrale Bereiche, die eine deutliche Streuung im Datensatz zeigen, werden in einem gemeinsamen Faktor beschrieben [TILLMANN 2006].

Bei der Zerlegung in PLS-Faktoren wird jedoch nicht ausschließlich die spektrale Varianz berücksichtigt<sup>2</sup>: Auch die Varianz des Inhaltsstoffes wird in die Faktorenanalyse einbezogen [FOSS 2007, TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004].



**Abb. 2-7:** Kalibrierung und Validierung in der Nahinfrarotspektroskopie.

Die maximale Anzahl der in der Kalibrationsberechnung einzusetzenden Faktoren richtet sich nach dem Umfang des Cal-Sets. Als Faustregel gilt, dass je Hauptkomponente ca. 10

<sup>2</sup> Ein weiteres multivariates Kalibrationsverfahren, bei dem jedoch ausschließlich spektrale Informationen in der Hauptkomponentenzerlegung berücksichtigt werden, ist PCR (*principle component regression*).

Proben notwendig sind [FOSS 2007, ISI 1999]. Die optimale Anzahl der Faktoren für die Kalibrationsberechnung wird in der **Kreuzvalidierung** bestimmt. Dabei wird der Kalibrierprobensatz in  $n$  Gruppen aufgeteilt<sup>3</sup>, die Berechnung der Kalibrierung erfolgt anhand von  $n-1$  Gruppen. Die nicht berücksichtigten Proben dienen zur Validierung. Die Berechnungen werden solange wiederholt, bis jede Gruppe einmal zur Validierung genutzt worden ist. Nach dem letzten Durchgang werden die statistischen Kenngrößen der Durchgänge gemittelt und die Anzahl der Faktoren bestimmt, bei der die Kalibrierung den kleinsten Fehler (SECV) aufweist. Mit diesen Faktoren erfolgt anschließend die endgültige Berechnung der Kalibrierfunktion [FOSS 2007, ISI 1999, TILLMANN 2006].

Den abschließenden Punkt der Kalibrationsentwicklung stellt die **Validierung** dar. Dabei wird die Güte der Kalibrierung an einem unabhängigen Probensatz (Val-Set) beurteilt. Die Validierproben müssen aus der gleichen Grundgesamtheit wie die Kalibrierproben stammen und dürfen nicht im Cal-Set enthalten sein. Der Umfang des Val-Sets sollte laut TILLMANN [2006] bei mindestens 30 Proben liegen. WILLIAMS [2004] empfiehlt generell ein Verhältnis von Kalibrier- zu Validierproben von 3:1. Bei kleineren Gesamtprobenzahlen (zwischen 60 und 100) sollte die Aufteilung in 2 gleichgroße Sets und die reziproke Nutzung als Cal- bzw. Val-Set erfolgen. Bei einem auf 60 Spektren limitierten Probensatz ist die Evaluierung der Güte der Kalibrierung ausschließlich in der Form der Kreuzvalidierung ratsam.

Von den Validierproben werden NIR-Spektren aufgenommen und mit der entwickelten Kalibrierfunktion ausgewertet. Die Gegenüberstellung der vorhergesagten NIRS-Werte und der nasschemisch ermittelten Referenzwerte liefert diverse Gütekriterien zur Beurteilung der Kalibration (s. Abschnitt 2.1.2.3).

### 2.1.2.2 Spektrentransformation

NIR-Spektren sind sehr komplex und schwierig zu interpretieren, da sich ein Spektrum aus den Absorptionen aller Molekülbindungen in der Probe zusammensetzt. Dabei zeigt an fast jeder Wellenlänge mehr als ein Inhaltsstoff Absorptionen und es kommt zu Überlagerungen von Absorptionsbanden [BOKOZBA 1998, ISI 1999, TILLMANN 2006].

Neben den Inhaltsstoff-bedingten Informationen sind häufig noch andere Einflüsse, wie z.B. Streulichteefekte und instrumentelle Artefakte (elektronisches Rauschen, Basislinienverschiebungen), in den Spektren enthalten. Um die für die Kalibrations-

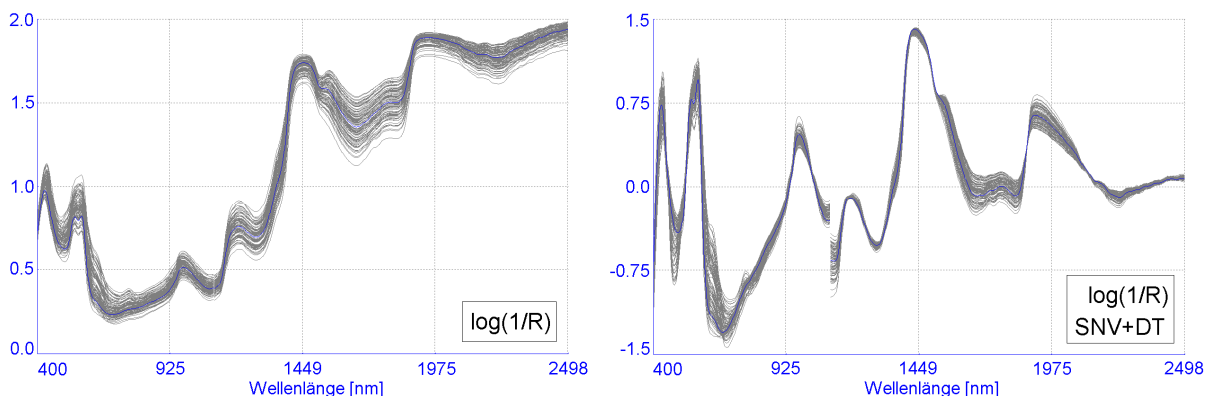
---

<sup>3</sup> Die Mindestanzahl der Kreuzvalidierungsgruppen sollte bei 4 liegen, so dass eine Durchführung von wenigstens 3 Kreuzvalidierungen möglich ist [ISI 1999].

berechnung essentiellen Informationen zu betonen und nicht relevante Inhalte zu reduzieren, stehen verschiedene Möglichkeiten der mathematischen Spektrenbearbeitung zur Verfügung [ISI 1999, TILLMANN 2006].

Streulichteefekte, die sich auf Grund der Partikelgröße und -lage ergeben, können mit Hilfe der **Streulichtkorrektur** (scatter correction) ausgeglichen werden. Geläufige Verfahren für diese Art der Spektrentransformation sind SNV (standard normal variate), DT (detrend) und MSC (multiplicative scatter correction).

Bei SNV werden die Spektren auf eine Standardabweichung von 1 zur Basislinie standardisiert [FOSS 2007]. SNV wird generell in Verbindung mit DT eingesetzt. DT entfernt lineare und quadratische Trends in den Spektren [TILLMANN 2006]. Beispiele für Spektren vor und nach Anwendung der Streulichtkorrektur SNV+DT zeigt Abbildung 2-8. Das Verfahren MSC gleicht Streulichteefekte durch die Berechnung einer Regression von jedem Spektrum auf das Durchschnittsspektrum des Probensatzes aus [FOSS 2007].



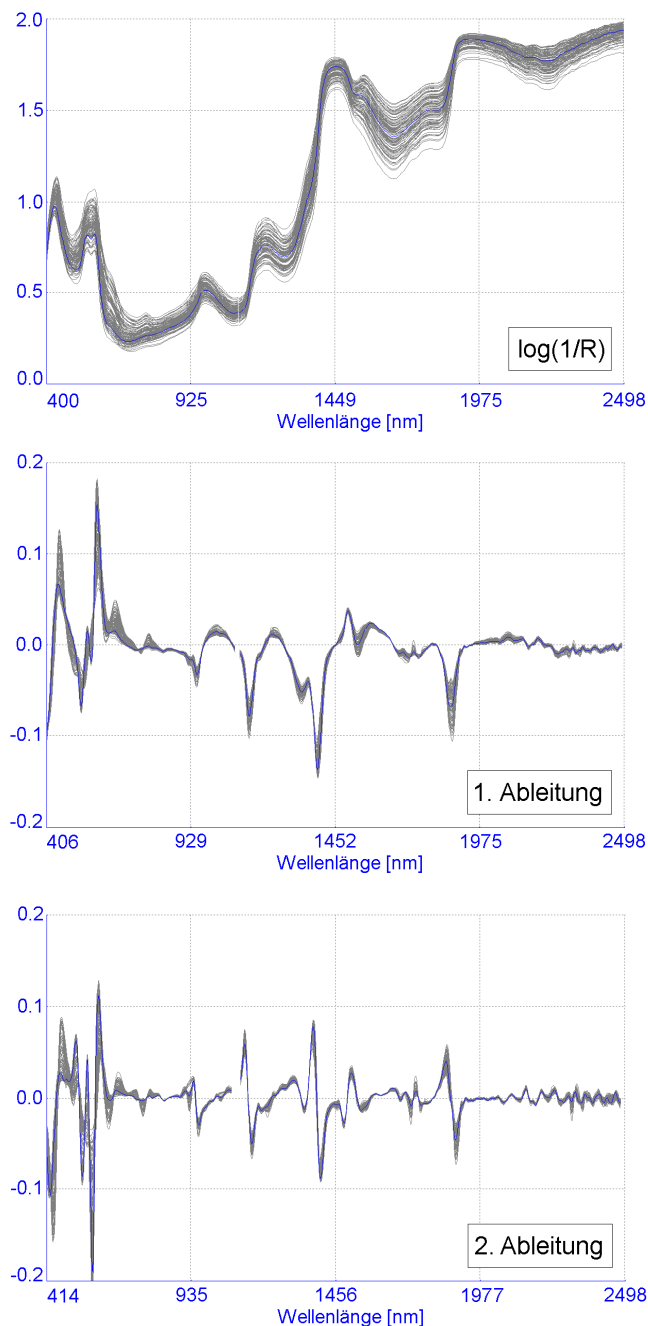
**Abb. 2-8:** Streulichtkorrektur SNV+DT am Beispiel von Rindfleischspektren ( $n = 95$ )  
Spektren im Original (links) und nach Transformation (rechts).

Eine weitere Möglichkeit, unerwünschte Informationen in den Spektren zu reduzieren, ist die Bildung von **Ableitungen**<sup>4</sup> [HRUSCHKA 2004, TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004]. Maxima von Absorptionspeaks im Originalspektrum werden in der ersten Ableitung zu Nullstellen, wodurch die im Originalspektrum an den Flanken des Peaks liegenden Wellenlängen in der ersten Ableitung an Bedeutung gewinnen. In der zweiten Ableitung befinden sich die Peaks wieder an der Position wie im Originalspektrum, jedoch in negativer Ausrichtung. In Abbildung 2-9 lässt sich dieser Sachverhalt am Beispiel der Wasserbande bei 1450 nm verfolgen: In der ersten Ableitung wird aus dem Peak eine Nullstelle; es entstehen jedoch aussagekräftige Peaks bei 1388 und 1498 nm. Würde es sich in der Abbildung um

<sup>4</sup> math.: Anstieg einer Linie an einem beliebigen Punkt



Spektren der Reinsubstanz Wasser handeln, wäre in der zweiten Ableitung der Peak wieder an der ursprünglichen Stelle bei 1450 nm zu finden. Da die dargestellten Spektren jedoch von den in dieser Arbeit eingesetzten Rindfleischproben stammen, wird dieser Sachverhalt nicht deutlich. Die Rindfleischspektren sind das Resultat eine Vielzahl von infrarotaktiven Komponenten, die das Erscheinungsbild des Wasserpeaks in der zweiten Ableitung beeinflussen.



**Abb. 2-9:** Ableitungen von Spektren am Beispiel von Rindfleischproben ( $n = 95$ ).

Mit Hilfe dieser mathematischen Spektrenvorbehandlung werden Verschiebungen der Basislinie und die durch Partikeleffekte hervorgerufene spektrale Variation eliminiert. Auch die Separierung überlappender Absorptionsbanden ist durch die Bildung von Ableitungen realisierbar [HRUSCHKA 2004, TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004].

Unter den zahlreichen Möglichkeiten der Spektrentransformation gibt es jedoch keine allgemeingültige Kombination, die für alle Matrices und jeden Parameter als optimal anzusehen ist. In der Nahinfrarotspektroskopie ist es nur durch „trial and error“ möglich, die Einstellungen zu finden, die für einen gewünschten Parameter die beste Präzision der Vorhersage liefern [ISI 1999, WILLIAMS 2004].

Erfahrungen in der Praxis haben gezeigt, dass die Anwendung der ersten oder zweiten Ableitung in Verbindung mit der Streulichtkorrektur SNV+DT bei vielen Fragestellungen zu guten Ergebnissen führt [FOSS 2007, ISI 1999, TILLMANN 2006].

### **2.1.2.3 Kriterien zur Beurteilung einer Kalibration**

Nach der Berechnung und Validierung der Kalibrierfunktion ist es anhand statistischer Kenngrößen möglich, die Güte, d.h. die Eignung einer Kalibrierung zur Vorhersage eines Parameters in unbekannten Proben, zu beurteilen. Dabei liefert vor allem die Validierung essentielle Gütekriterien für die Abschätzung der zu erwartenden Leistungsfähigkeit einer Kalibrierung.

**Standardfehler.** Der Standardfehler gibt die Standardabweichung der Differenzen von NIRS- und Referenzwerten an. Je nachdem, um welchen Schritt der Kalibrationsentwicklung es sich handelt, unterscheidet man zwischen dem Fehler der Kalibrierung (SEC, *standard error of calibration*), der Kreuzvalidierung (SECV, *standard error of cross validation*) und der Validierung (SEP, *standard error of prediction*). In der Regel ist folgende Größenordnung zu erwarten:  $SEC < SECV < SEP$ . Die Einheit des Fehlers entspricht der des untersuchten Parameters. [FOSS 2007, TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004]

Der SECV ist ein Schätzwert für den zu erwartenden Messfehler. Als Maß für die tatsächliche Leistungsfähigkeit der Kalibrierung ist der SEP anzusehen, da er sich aus der Anwendung der Kalibrierfunktion an einem unabhängigen Datenset ergibt [DAVIES AND FEARN 2006, FOSS 2007, TILLMANN 2006]. Eine gute Kalibrierung zeichnet sich durch einen SEP aus, der das Doppelte des Fehlers der Referenzmethode (SEL, *standard error of laboratory*) nicht übersteigt. Bei der NIRS-Methode handelt es sich um ein indirektes

Verfahren, das auf referenzmethodisch ermittelten Daten basiert. Aus diesem Grund kann der Fehler der NIRS-Methode nie kleiner werden als der Fehler des zugrunde liegenden Referenzverfahrens [FOSS 2007, TILLMANN 2006].

**R<sup>2</sup>** (RSQ, Bestimmtheitsmaß). Das Bestimmtheitsmaß verdeutlicht den Anteil der Varianz in den vorhergesagten NIRS-Werten, der auf die Varianz in den Referenz-Daten zurückzuführen ist. Es ist dimensionslos und nimmt Werte zwischen 0 und 1 an, wobei ein Wert nahe 1 bedeutet, dass die Variation im Cal-Set durch die Kalibrierfunktion gut erklärt werden kann. Mathematisch ist das Bestimmtheitsmaß das Quadrat des Korrelationskoeffizienten „r“, der das Ausmaß, in welchem zwei Datensätze (Referenz- und NIRS-Werte) übereinstimmen, angibt [TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004].

Die Kalibrationsentwicklung unter Durchführung von Kreuzvalidierung und Validierung liefert drei Bestimmtheitsmaße: das Bestimmtheitsmaß der Kalibrierung (RSQ<sub>cal</sub>), der Kreuzvalidierung (1-VR<sup>5</sup>) und der Validierung (RSQ<sub>val</sub>). Mit einem Bestimmtheitsmaß  $\geq 0,83$  sind Kalibrierungen als praktikabel anzusehen [WILLIAMS 2004]. Detaillierte Richtlinien für die Interpretation des Bestimmtheitsmaßes enthält Tabelle 2-2. Die Höhe des Bestimmtheitsmaßes wird stark von der Streuung des Parameters beeinflusst: Ein enger Variationsbereich führt dabei i.d.R. zu niedrigen Bestimmtheitsmaßen [DAVIES AND FEARN 2006, TILLMANN 2006].

**Tab. 2-2:** Richtlinien für die Interpretation von R<sup>2</sup> [modifiziert nach WILLIAMS 2004]

R <sup>2</sup>	Interpretation
$\leq 0,25$	nicht geeignet für NIRS-Kalibration
0,26 - 0,49	zu geringe Korrelation
0,50 - 0,65	nutzbar für grobe Klassifizierungen
0,66 - 0,82	nutzbar für Klassifizierungen und andere „angenäherte“ Kalibrationen
0,83 - 0,91	unter Vorbehalt für die meisten Anwendungen nutzbar (inkl. Forschung)
0,92 - 0,96	für die meisten Anwendungen geeignet (inkl. Qualitätssicherung)
$\geq 0,98$	für jede Anwendung geeignet

<sup>5</sup> Die Bezeichnung „Bestimmtheitsmaß“ ist für diese Kennzahl mathematisch nicht korrekt, deshalb erfolgt die Angabe als „1-variance ratio“. Die Bedeutung entspricht jedoch der eines Bestimmtheitsmaßes [FOSS 2007, TILLMANN 2006].

**Slope.** Bei dem Kriterium „*slope*“ handelt es sich um den Anstieg der Regressionsgeraden der NIRS-Werte auf die Referenzwerte. Der Anstieg kennzeichnet das Ausmaß, in dem sich NIRS-Werte relativ zu den Referenzwerten ändern. Bei einem Idealwert von 1,0 würde die gleiche Änderungsrate in beiden Datensätzen vorliegen. Ist dies nicht der Fall, kann eine *slope*-Anpassung erfolgen. In der Regel ist eine solche Korrektur bei Abweichungen  $> 1,05$  bzw.  $< 0,95$  ratsam, da die NIRS-Vorhersage andernfalls Werte unter- bzw. überschätzt. Durch die Maßnahme der *slope*-Anpassung wird der Fehler bei einer Vorhersage im Extrembereich der Referenzwerte verringert und die Richtigkeit der NIRS-Methode verbessert. [TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004].

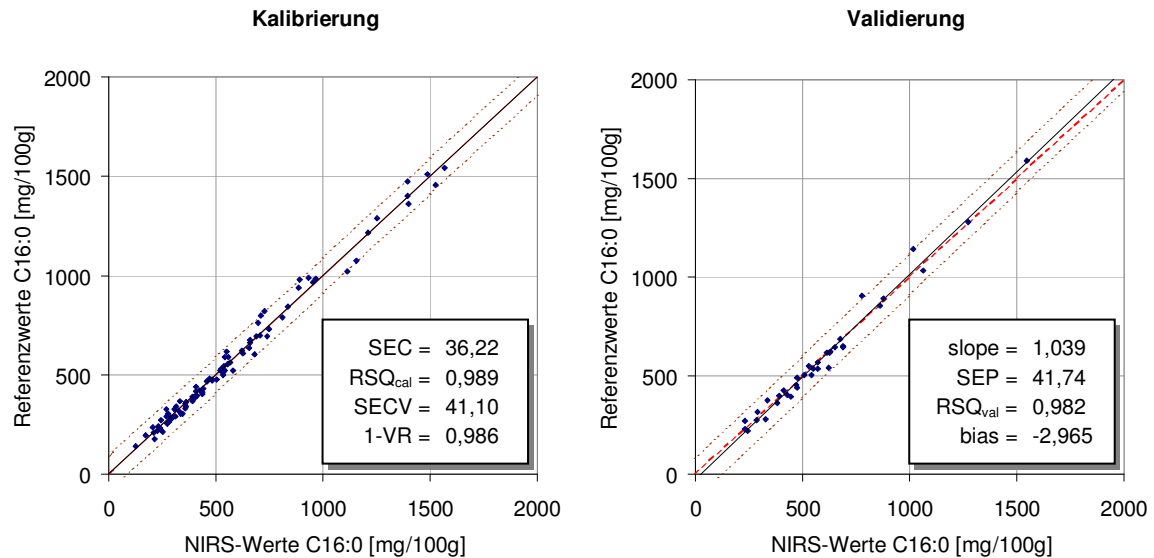
**Bias.** Der „*bias*“ ergibt sich aus der Validierung und spiegelt die durchschnittliche Differenz zwischen NIRS- und Referenzwerten wieder. Mit Hilfe dieses Kriteriums lässt sich ein systematischer Fehler (einseitige Messabweichung) erkennen. Beim Auftreten eines signifikanten *bias* ist die Durchführung einer Anpassung ratsam. Zusammen mit dem SEP ist der *bias* ein Maß für die Richtigkeit der Kalibration [TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004].

**RPD (*residual predictive value*).** Der RPD-Wert ist eine Kennzahl zur Beurteilung des SEP in Bezug auf die Standardabweichung der Referenzwerte. Der SEP verdeutlicht die Richtigkeit einer Kalibrierung. Ist der SEP sehr viel kleiner als die Standardabweichung der Referenzwerte, kann die Streubreite der Referenzwerte von der Kalibrierung akkurat wiedergegeben werden. Im Umkehrschluss sind somit auch Referenzwerte mit einer möglichst großen Standardabweichung (hohe Variation) eine wesentliche Voraussetzung für die Entwicklung zuverlässiger NIRS-Kalibrierungen [FOSS 2007].

Rechnerisch ist der RPD der Quotient aus der Standardabweichung der Referenzwerte des Val-Sets und dem SEP. Wünschenswert sind RPDs  $\geq 5$ , bei einer geringen Streuung des Parameters im Datenset ist ein Wert von mindestens 3 akzeptabel [WILLIAMS 2004].

Eine gute Möglichkeit, einen ersten Eindruck von der Güte der Kalibrierung zu erhalten, ist die grafische Gegenüberstellung der NIRS- und Referenzwerte (Abb. 2-10). In dieser Darstellung wird schnell ersichtlich, ob die geschätzten NIRS-Werte mit den Referenzwerten übereinstimmen und eine Vorhersage des Parameters mit NIRS sinnvoll möglich ist. In Abbildung 2-10 streuen die Datenpunkte in der Kalibrierung für Palmitinsäure über den gesamten Wertebereich eng um die Regressionsgerade, was auf eine erfolgversprechende Kalibrierung hindeutet. In der Validierung bestätigt sich die Eignung von NIRS zur Vorhersage absoluter Palmitinsäuregehalte in Rindfleisch: Die Datenpunkte liegen eng um die Regressionsgerade verteilt, deren Anstieg nur

unwesentlich von dem der Winkelhalbierenden (idealer Anstieg von 1) abweicht. Die Geraden sind annähernd deckungsgleich, was auf eine akkurate Vorhersage ohne signifikanten systematischen Fehler (*bias*) hinweist.



**Abb. 2-10:** Graphische Darstellung von Kalibrierung ( $n = 96$ ) und Validierung ( $n = 36$ ) am Beispiel des Palmitinsäuregehaltes in Rindfleisch (— Regressionsgerade, --- t-Ausreißergrenze, — Winkelhalbierende).

Von mehreren Kalibrierungen für einen Parameter ist diejenige am besten für die zuverlässige Vorhersage des Parameters in unbekannten Proben geeignet, die den geringsten SEP (bzw. den höchsten RPD-Wert) aufweist [DAVIES AND FEARN 2006, TILLMANN 2006, WILLIAMS 2004].

## 2.2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.2.1 TIERE

#### 2.2.1.1 Rinder

An der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft wurden bis März 2007 Nachkommen von Zuchtbullen der Rasse Fleckvieh gemäß der „*Richtlinie für Leistungsprüfungen und Zuchtwertfeststellungen bei Rindern*“ auf Fleischleistung in Station geprüft [BStMLF 2003]. Das im Rahmen dieser Nachkommenprüfung (NKP) in den Jahren 2006 und 2007 im Zentrallabor Grub untersuchte Rindfleisch wurde in der vorliegenden Arbeit eingesetzt. Die Entwicklung der NIRS-Kalibrierungen erfolgte jedoch nicht ausschließlich an den Proben der NKP-Bullen (Versuchsstation Westerschondorf). Zur Erhöhung der Variation in den Datensätzen wurde außerdem Fleisch von Ochsen der Rasse Fleckvieh eingesetzt, welches aus einem Fütterungsversuch in 2007 zur Verfügung stand.

**Haltung und Futter.** Die NKP-Bullen wurden im Alter von 6 Wochen auf den Versuchstationen Westerschondorf und Schwarzenau eingestallt. Während der Aufzuchtphase (Umstellung der Fütterung, Milchentwöhnung) wurden die Tiere in Laufställen mit Einstreu gehalten. Für die sich anschließende Mastperiode (24. bis 65. Lebenswoche) erfolgte eine Umstallung in Laufställe mit Spaltenboden. Als Grundfutter erhielten die Bullen während der Mastperiode Maissilage, ergänzt mit Kraftfutter (Tab. 2-3). Wasser stand *ad libitum* zur Verfügung.

**Probennahme.** Im Alter von 450 ( $\pm 3$ ) Tagen erfolgte die Schlachtung der Rinder in Grub (Bullen der Versuchstation Westerschondorf, Ochsen) bzw. Rimpar (Bullen der Versuchstation Schwarzenau). Gemäß der Tierschutz-Schlachtverordnung [BMELV 2006] wurden die Tiere nach der Betäubung mittels Bolzenschussgerät entblutet.

Die Entnahme einer Probe aus dem *M. longissimus dorsi* (rechte Schlachthälfte, auf Höhe der 9. Rippe) erfolgte 24 h *post mortem*. Das Fleisch der in Grub geschlachteten Tiere wurde umgehend in das Zentrallabor geliefert. Die Proben der Bullen aus Schwarzenau wurden gekühlt und per Kurier nach Grub geschickt.

**Tab. 2-3:** Futterplan für die Bullenmast

		<b>Vormast</b> (24. bis 49. Woche)	<b>Endmast</b> (50. bis 65. Woche)
Maissilage	kg/d	9,6 ... 16,9	17,0 ... 17,6
Krafftuttermischung	kg/d	2,1 ... 3,0	3,2 ... 3,6
<i>davon Maisschrot</i>	%	25,0	30,0
<i>Gerstenschrot</i>	%	18,0	23,0
<i>Sojaschrot</i>	%	50,5	40,5
<i>kohlensaurer Futterkalk</i>	%	3,0	3,0
<i>Mineralfutter</i>	%	3,0	3,0
<i>Viehsalz</i>	%	0,5	0,5
Heu/Stroh	kg/d	0,3	0,3

### 2.2.1.2 Schweine

Entsprechend der „*Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein*“ [ZDS 2007] wird an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft eine Leistungsprüfung durchgeführt. Dabei werden Leistungsdaten von Schweinen folgender Rassen und Kreuzungen erfasst:

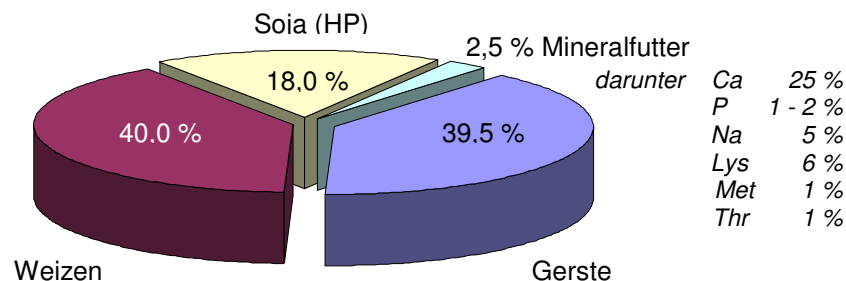
- Deutsches Edelschwein
- Deutsche Landrasse
- Pietrain
- Deutsche Landrasse x Deutsches Edelschwein
- Deutsches Edelschwein x Deutsche Landrasse

Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten NIRS-Kalibrierungen basieren sowohl auf Fleisch von Tieren, die im Jahr 2007 geprüft wurden (Prüfstation Grub), als auch auf Proben von Schweinen dänischer Herkunft, für die im Rahmen eines Mastversuches in den Jahren 2006 und 2007 Daten an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft erhoben wurden.

**Haltung und Futter.** Nach der Aufzucht in einer separaten Quarantänestation erfolgte im Alter von 9 Wochen die Einstallung der Ferkel auf den Prüfstationen Grub und Schwarzenau. Die Tiere wurden in Buchten mit Spaltenboden gehalten (in Gruppen von 12 - 14 Tieren).

Als Futter wurde eine standardisierte Prüffuttermischung (Abb. 2-11) mit einem

Energiegehalt  $\geq 13,4$  MJ/kg und einem Rohproteingehalt  $\geq 16,4$  % eingesetzt. Ein automatisches Fütterungssystem ermöglichte die Erfassung der *ad libitum* aufgenommenen, individuellen Futtermenge der mit Transpondern markierten Tiere. Wasser stand ebenfalls *ad libitum* über eine Selbsttränkeeinrichtung zur Verfügung.



**Abb. 2-11:** Zusammensetzung des Futters in der Schweinemast

**Probennahme.** Bis August 2006 wurde den Tieren bei der Einstellung auf den Prüfstationen eine Ohrgewebeprobe entnommen und von der Firma *Agrobiogen* (Hilgertshausen, Deutschland) eingelagert. Auf Anfrage konnte bis Ende 2008 DNA aus den gewünschten Proben durch *Agrobiogen* isoliert und bereitgestellt werden.

Mit einem Lebendgewicht  $\geq 105$  kg endete der Prüfzeitraum. Die Schlachtung der Tiere erfolgte jeweils vor Ort in Grub und Schwarzenau. Dabei wurden die Schweine entsprechend der Tierschutz-Schlachtverordnung [BMELV 2006] nach Dreipunktelektrobetäubung durch Entbluten getötet. Ab März 2006 wurde während der Entblutungsphase Blut für eine etwaige spätere Isolation von genetischem Material aufgefangen und bei  $-20$  °C gelagert.

Die Entnahme einer Probe aus dem *M. longissimus dorsi* (rechte Schlachthälfte, auf Höhe der 13. Rippe) erfolgte 24 h *post mortem*. Das Fleisch der in Grub geschlachteten Schweine wurde umgehend in das Zentrallabor verbracht. Die Proben der Tiere von der Prüfstation Schwarzenau wurden in gekühltem und bereits homogenisiertem Zustand (s. Abschnitt 2.2.2) per Kurier in das Zentrallabor geschickt.

## 2.2.2 PROBENVORBEREITUNG

Das Muskelfleisch wurde ausgelöst, vom Auflagefett befreit und in grobe Würfel geschnitten. Anschließend erfolgte die Homogenisierung des Probenmaterials mit der Messermühle Grindomix GM 200 (*Retsch*) für 1 min 20 s im Intervall-Modus. Rindfleisch wurde mit 7.000 rpm zerkleinert; bei Schweinefleisch wurden 6.000 rpm eingesetzt.



Bis zur Aufarbeitung für die gaschromatographische Fettsäureanalytik wurde ein Aliquot des Homogenats vakuumverpackt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren. Die nahinfrarotspektroskopischen Messungen am Homogenat erfolgten bei Rindfleisch noch am selben Tag. Die Spektren der Schweineproben wurden am Folgetag aufgenommen (Lagerung des homogenisierten Materials bis zur Messung bei  $4^{\circ}\text{C}$ ). Das ebenfalls nach diesem Verfahren homogenisierte Probenmaterial der Schweine aus Schwarzenau wurde am Tag des Eintreffens im Labor vermessen. Die Handhabung der Proben folgte einer standardisierten Routine, da bei wasserhaltigem Material die Temperatur einen Einfluss auf die spektrale Varianz hat [MILLER 2004, TILLMANN 2006, WILLIAMS AND NORRIS 2004].

### 2.2.3 FETTSÄUREANALYTIK

Die im Folgenden beschriebene Methode für die gaschromatographische Bestimmung der Fettsäurezusammensetzung von Rind- und Schweinefleisch wurde in einem projektinternen Laborvergleich mit den Partnern FBN Dummerstorf (Dr. K. Nürnberg) und ETH Zürich/SUISAG (Dr. M. Scheeder) validiert. Untersucht wurden dafür jeweils drei Fleischproben von Rind und Schwein, drei Rückenspeckproben vom Schwein und ein zertifiziertes Referenzfett (BCR-163 beef-pork fat blend, *IRMM*). Es ergaben sich sowohl eine gute Richtigkeit und Präzision (Wiederholbarkeit) der Analytik in den einzelnen Laboren als auch eine gute Übereinstimmung (Vergleichbarkeit) zwischen den Partnern [NÜRNBERG AND NÜRNBERG 2008].

#### 2.2.3.1 Lipidextraktion

Die Auswertung der im Vorfeld aufgenommenen NIR-Spektren mit bestehenden Kalibrierungen für den intramuskulären Fettgehalt (IMF) ermöglichte die Einwaage des Probenmaterials für die Fettsäurenbestimmung entsprechend dem Fettgehalt der Probe. Die IMF-Kalibrierungen basierten auf Daten, die nach Methode L 06.00-6 § 64 LFGB [2006] ermittelt worden waren. Der Fehler (SEP) der Fettgehaltsbestimmung mit NIRS lag sowohl für Rind- als auch für Schweinefleisch bei  $< 0,1\%$  [SCHUSTER et al. 2004]. Ein Aliquot des (wie unter Punkt 2.2.2 beschrieben) homogenisierten Probenmaterials wurde so eingewogen, dass 40 - 60 mg extrahierbare Lipide zur Verfügung standen. Für die spätere Quantifizierung der Fettsäuren wurden 0,5 mg Heneicosäuremethylester<sup>6</sup> als interner Standard hinzugegeben.

---

<sup>6</sup> Heneicosäure-ME in Chloroform/ Methanol (2:1, v/v);  
Konzentration: 10 mg/ml, pipettiertes Volumen: 50  $\mu\text{l}$

Die Extraktion der Lipide erfolgte mit Chloroform/Methanol (2:1, v/v) nach der Methode von FOLCH et al. [1957] mit leichten Modifikationen. Um dem Extraktionsmittel Chloroform eine möglichst große Angriffsfläche zu bieten, wurde die Probe zuerst mit einem Ultra Turrax (Modell T 25 basic, Dispergierwerkzeug S 25N - 10G, beides *IKA*) bei 10.000 rpm für 1 min in 20 ml Methanol dispergiert [CHRISTIE 1993]. Danach erfolgte die Zugabe von 40 ml Chloroform und eine weitere Dispergierung des Probe-Lösungsmittelgemisches für 2 min. Zur Gewährleistung der Vollständigkeit der Extraktion wurde die Probe für 1 h geschüttelt (Certomat R, *B. Braun*; 140 rpm). Anschließend wurde das Gemisch über einen Filter in einen Scheidetrichter überführt, in welchem 15 ml Kaliumchloridlösung (0,88 %, w/v) vorlagen. Durch die Vereinigung von Probe-Lösungsmittelgemisch und wässriger Salzlösung entstand ein 2-Phasen-System. Nach zweimaligem Durchmischen des Systems (Schütteln) und Abwarten der vollständigen Phasentrennung wurde die untere, organische Phase über Natriumsulfat abfiltriert. Zur Bereitstellung von etwa 10 mg extrahierter Lipide für die Derivatisierung wurde das Lösungsmittel eines 8 ml-Aliquot des Filtrats unter Stickstoff bei 35 °C evaporiert (TurboVap LV Evaporator, *Zymark*).

### **2.2.3.2 Derivatisierung**

Die mit dem oben geschilderten Verfahren gewonnenen Lipide wurden entsprechend der DGF-Einheitmethode C-VI 11e [DGF 2007] mit Trimethylsulfoniumhydroxid (TMSH) zu Fettsäuremethylestern (FAME) derivatisiert. Zu diesem Zweck wurden 10 mg der extrahierten Lipide in 500 µl tert-Butylmethylether (tBME) gelöst. Ein Aliquot dieser Lösung verblieb als Rückstellprobe. Zum Schutz der mehrfach ungesättigten Fettsäuren vor Autoxidation enthielt das Lösungsmittel 50 ppm Butylhydroxytoluol (BHT) als Antioxidanz [CHRISTIE 2003].

Für die GC-Analyse wurden 100 µl der in tBME gelösten Lipide mit 50 µl methanolischer TMSH-Lösung versetzt, 30 s geschüttelt und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Bis zur gaschromatographischen Analyse wurden die einspritzfertigen Proben bei -18 °C gelagert.

### **2.2.3.3 Gaschromatographie**

Die gaschromatographische Trennung der Fettsäuremethylester fand auf einer hochpolaren Kapillarsäule (SP-2380; 100 m x 0,25 mm; 0,2 µm Filmdicke; *Sigma-Aldrich*) in einem 6890N Network GC System (*Agilent Technologies*) statt. Die Probenzuführung erfolgte über einen automatischen Probengeber (Model 7683B; *Agilent Technologies*).

In den 260 °C heißen Einspritzblock wurde 1 µl Probe im Split-Modus injiziert. Die Splitrate betrug 1:45. Als Trägergas wurde Helium bei einem Säulenvordruck von 3,4 bar

(Methode: konstanter Druck; 18,85 cm/s bei 184 °C) verwendet. Die Ausgangstemperatur des Ofens lag bei 60 °C und wurde für 1 min gehalten. Danach erfolgte eine Erhöhung der Temperatur mit einer Rate von 8 °C/min auf 120 °C. Im nächsten Schritt wurde die Temperatur mit 1,5 °C/min auf 242 °C gesteigert und abschließend mit 8 °C/min auf 250 °C erhöht. Die Detektion erfolgte mit einem Flammenionisationsdetektor (FID). Die Detektortemperatur lag bei 260 °C.

Die Chromatogramme wurden mit der Software Chromeleon® Version 6.60 (Dionex) aufgezeichnet und ausgewertet. Die Identifizierung der einzelnen Fettsäuren erfolgte anhand der Retentionszeiten, die mit Hilfe von FAME-Standardsubstanzen (div. Hersteller, s. Anhang) ermittelt wurden. Die Standardsubstanzen dienten außerdem zur Kalkulation von Responsefaktoren für die einzelnen Verbindungen. Mit Hilfe dieser Faktoren wurde der jeweilige prozentuale Anteil der Fläche eines Fettsäuremethylesters an der Gesamtfläche aller FAME berechnet. Die Angabe der Ergebnisse erfolgte in „% FAME“ und wird in der vorliegenden Arbeit als relative Fettsäurezusammensetzung bezeichnet.

Für die absolute Bestimmung der Fettsäuren („mg Fettsäure/100 g Muskel“) wurden 4-Punkt-Eichkurven mit den Standardsubstanzen erstellt. Die Berechnung der Fettsäuregehalte erfolgte unter Berücksichtigung der Faktoren für die Umrechnung der FAME in Fettsäuren. Außerdem wurde der Korrekturfaktor des internen Standards (IS) Heneicosäuremethylester einbezogen. Diese Fettsäure wurde auf Grund ihrer Abwesenheit in Fleisch, der Lage im Chromatogramm und den Erfahrungen in der Praxis [ALDAI et al. 2006, ENSER et al. 1998, KRAMER et al. 2001] als IS eingesetzt. Wie bei CHRISTIE [1989] empfohlen, erfolgte die Zugabe des IS bereits vor der Extraktion.

#### 2.2.3.4 Berechnung des Laborfehlers (SEL)

Die Berechnung der Laborfehler (SEL, *standard error of laboratory*) für die einzelnen Fettsäureparameter erfolgte anhand der Daten aus den Doppelbestimmungen nach folgender Formel [FOSS 2007, TILLMANN 2006]:

$$SEL = \sqrt{\frac{\sum_i (\text{Referenzwert } 1_i - \text{Referenzwert } 2_i)^2}{n-1}}$$

mit  $i = 1 \dots n$  Proben.

## 2.2.4 NAHINFRAROTSPEKTROSKOPIE

### 2.2.4.1 Messungen

Das homogenisierte Probenmaterial wurde in runde Messzellen (IH-0307, *Foss*) unter Vermeidung von Luftblasen eingestrichen und über ein hausintern entwickeltes Schienensystem dem NIR-Spektrometer Modell 6500 mit Spinning Sample Modul (*Foss*) zugeführt. Im Spektrometer erfolgte die Messung der Probenzelle im Reflexionsmodus über den gesamten Wellenlängenbereich von 400 - 2500 nm in 2 nm-Schritten (1050 Datenpunkte). Insgesamt wurde jede Probe 32-mal gescannt, wobei sich die Zelle nach jedem Scan etwas drehte, sodass nach den 32 Messungen eine vollständige Umdrehung vorlag. Die Spektren der Einzelscans wurden zu einem charakteristischen Probenspektrum gemittelt und unter einer individuellen Proben-ID gespeichert. Die Aufnahme der Spektren erfolgte mit der Software ISIScan v4.0 (*InfraSoft International*).

### 2.2.4.2 Datensätze

Die Auswahl der Spektren für die Cal-Sets erfolgte mit Hilfe der Prozedur „SELECT“ der Kalibrationssoftware WinISI II v1.02A (*InfraSoft International*). Mit diesem Algorithmus können diejenigen Proben selektiert werden, die die Population am besten repräsentieren. Dafür ist vorab die Zerlegung der Spektren in Hauptkomponenten (*principle component analysis*, PCA) erforderlich. Im Unterschied zur Faktorenanalyse für die Kalibrierung können hierbei lediglich die spektralen Informationen genutzt werden, da Referenzwerte noch nicht vorliegen.

Die Reduktion der spektralen Information in  $n$  Hauptkomponenten erlaubt die Darstellung des Spektrums als Datenpunkt in einem  $n$ -dimensionalen Koordinatensystem. In dieser Darstellung ist der Vergleich eines Probenspektrums mit dem Durchschnittsspektrum der Population und mit den benachbarten Spektren möglich. H-Werte (Mahalanobis-Distanz) dienen hierbei als Kennzahlen. Der Abstand eines Probenspektrums vom Mittel der Population wird als **globaler H-Wert** (GH) angegeben. Als Grenze für den GH-Wert gelten Werte zwischen 3 und 5, wobei 3 eine eher konservative und 5 ein liberales Limit darstellt [FOSS 2007, ISI 1999]. Probenspektren, deren GH-Werte den Grenzwert überschreiten, sind Ausreißer und sollten nicht in die Kalibrationsentwicklung einfließen [TILLMANN 2006].

Eine zweite Möglichkeit, die Zugehörigkeit einer Probe zu einer Population zu beschreiben, ist der **Nachbarschafts-H-Wert** (NH). Diese Kennzahl spiegelt den Abstand

eines Probenspektrums zum nächsten Nachbarn wieder. Bei Überschreitung des NH-Wertes von 0,6 gilt eine Probe als Nachbarschaftsausreißer [ISI 1999].

Bei Routinemessungen dienen GH- und NH-Werte zur Überprüfung, ob eine unbekannte Probe den Kalibrierproben ähnelt und eine Auswertung ihres Spektrums mit der Kalibrierfunktion zuverlässig möglich ist. Auf diesem Weg erlauben GH- und NH-Werte auch die Identifizierung von Proben, die zusätzliche Informationen liefern und in die Kalibrierung aufgenommen werden sollten [FOSS 2007, TILLMANN 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurden NIR-Spektren von 417 Rinder- und 303 Schweinemuskelproben mit dem Verfahren PCA der Software WinISI II v1.02A (*InfraSoft International*) in Hauptkomponenten zerlegt. Die Hauptkomponentenanalyse erfolgte nach Transformation der Spektren (Tab. 2-4). Bei den Rinderproben wurde das gesamte Spektrum von 400 bis 2500 nm berücksichtigt. Die Schweinespektren wurden auf 1108 bis 1850 nm gekürzt, da dieser Spektralbereich sehr gute Ergebnisse bei der Kalibrationsentwicklung für den Parameter IMF geliefert hatte [SCHUSTER et al. 2004].

**Tab. 2-4:** Vorbehandlungen der Spektren für die Auswahl der Kalibrierproben

Kriterium	Rind	Schwein
Ableitung	1-4-4-1	1-5-5-1
Streulichtkorrektur	SNV+DT	SNV+DT
Wellenlängenbereich	400 - 2500, 8	1108 - 1850, 8

Die Prozedur „SELECT“ beurteilt die Spektren auf Basis der Nachbarschafts-H-Werte [ISI 1999]. Eng benachbarte Proben haben statistisch die gleichen Spektren und nur eine Probe aus dieser „Nachbarschaft“ wird für das Cal-Set selektiert.

Die Anwendung des Algorithmus lieferte für Rind 96 Spektren, die in das Cal-Set aufgenommen wurden. Beim Schwein spiegelten 77 Proben den Datensatz am Besten wieder.

Die Auswahl der Proben für die Validierung erfolgte zufällig. Für die Matrix Rindfleisch wurde ein Val-Set mit 36 Proben zusammengestellt. Beim Schwein fand die abschließende Kalibrationsbeurteilung an 72 Proben statt.

### 2.2.4.3 Kalibrierung

Die Kalibrationsberechnungen erfolgten mit der Software WinISI II v1.02A (*InfraSoft International*). Folgende Einstellungen wurden sowohl für relative wie auch für absolute Fettsäureparameter in Rind- und Schweinefleisch eingesetzt:

*Regression method:* mPLS (modified partial least squares)

Bei dieser Variante der PLS-Regression erfolgt während der Faktorenerlegung nach jeder Iteration eine Standardisierung der „Restspektren“ [FOSS 2007]. Nach FOSS [2007] werden mit dieser Methode die besten Ergebnisse erzielt.

*Maximum number of terms:* Vorschlag der Software angenommen.

(Rindfleisch: 9 Faktoren, Schweinefleisch: 8 Faktoren)

*Cross validation groups:* Vorschlag der Software angenommen.

(6 Kreuzvalidierungsgruppen)

*Number of outlier elimination passes:* 2

Vor der endgültigen Berechnung der Kalibrierfunktion wurden in 2 Durchgängen Ausreißer eliminiert.

*Critical “T” outlier value:* 2,5

T-Ausreißer sind Proben, die eine zu große Abweichung des geschätzten NIRS-Wertes vom Referenzwert aufweisen. Ein T-Wert von 2,5 besagt, dass die Abweichung des NIRS-Wertes vom Referenzwert 2,5-mal so groß ist wie der Fehler der Kalibrierung (SECV bzw. SEC). Ein Grenzwert von 3 gilt als konservativ, ein Wert von 2 als liberal. Der empfohlene Grenzwert ist 2,5 [ISI 1999, TILLMANN 2006].

*Critical “GH” outlier value:* 10

Spektren, die einen zu großem Abstand vom Populationsmittel haben, sind GH-Ausreißer. Die empfohlene Einstellung für den GH-Grenzwert ist 10 [ISI 1999].

*Critical “X” outlier value:* 10

Der X-Wert beschreibt den Mittelwert der Absorptionen an allen Wellenlängen eines Spektrums. X-Ausreißer sind ungewöhnliche Spektren, deren X-Wert sich stark vom durchschnittlichen X-Mittelwert aller Spektren unterscheidet. Empfohlen wird hier ein Grenzwert von 10 [ISI 1999].

*Downweight outliers: no*

Die Software bietet die Möglichkeit, T-Ausreißer geringer zu gewichten. Diese Option ist empfehlenswert, wenn eine Vielzahl fehlerhafter Referenzwerte im Datenset zu erwarten sind [FOSS 2007, ISI 1999].

*Math treatment:*

Als mathematische Vorbehandlungen der Spektren (Ableitungen) wurden die bei ISI [1999] empfohlenen Einstellungen 1-4-4-1, 2-6-4-1 und 3-5-5-1 angewendet. In dieser Notation steht die erste Ziffer für die Ableitung (*derivative*). Die zweite Stelle beschreibt die Schrittbreite (*gap*), über die die Ableitung berechnet werden soll. Die dritte Ziffer gibt die Anzahl der Datenpunkte an, über die eine Glättung (*smooth*) bei der Berechnung der Ableitung durchzuführen ist. Dabei sollte die Anzahl der für die Glättung gewählten Datenpunkte nie größer sein als die Anzahl der in der Schrittbreite eingestellten Datenpunkte. Die vierte Stelle verschlüsselt eine zweite Glättung (*second smooth*), die nach ISI [1999] jedoch nicht empfehlenswert ist und immer 1 gesetzt werden sollte.

Zusätzlich zu den empfohlenen Einstellungen wurde die in der Bestimmung des IMF-Gehaltes etablierte Vorbehandlung 1-5-5-1 genutzt. Bei den Daten für Schweinefleisch wurden außerdem noch die Einstellungen 0-5-5-1, 2-5-5-1 und 0-20-10-1 getestet.

*Scatter correction:*

Als Streulichtkorrektur wurde das allgemein empfohlene Verfahren SNV+DT angewendet [FOSS 2007, ISI 1999, TILLMANN 2006]. An den Spektren von Schweinefleisch wurde außerdem getestet, ob mit dem Einsatz von SNV, DT oder MSC bzw. mit dem Verzicht auf eine Streulichtkorrektur die Präzision der Kalibrierungen verbessert werden kann.

*Wavelength:*

Die Option der Einschränkung des Wellenlängenbereiches bietet eine weitere Möglichkeit, spektrale Informationen, die für die Kalibrierung irrelevant sind auszuschließen [WILLIAMS 2004]. In der vorliegenden Arbeit wurden Kalibrierungen sowohl unter Berücksichtigung des gesamten Spektrums von 400 bis 2500 nm als auch unter Verwendung wie folgt eingegrenzter Wellenlängenbereiche entwickelt:

ohne sichtbaren Bereich: 800 - 2500 nm

ohne sichtbaren und langwelligeren Bereich: 800 - 2000 nm

ohne langwelligeren Bereich: 400 - 2000 nm (nur Schwein)

Bereich der Bleisulfid-Detektoren: 1100 - 2500 nm

Bereich der Bleisulfid-Detektoren (gekürzt): 1108 - 2230 nm (nur Rind)

Bereich wie in IMF-Kalibrierung: 1108 - 1850 nm

Bei den Spektren von Rindfleisch wurde außerdem eine Zusammenstellung diverser Segmente getestet, die in der ersten Ableitung hohe Korrelationen mit dem Parameter IMF gezeigt hatten. Dabei handelte es sich im Einzelnen um die Wellenlängenbereiche von 1124 - 1160, 1284 - 1366, 1470 - 1486, 1510 - 1576, 1730 - 1740, 1794 - 1820 und 1940 - 2220 nm.

Wie bei FOSS [2007], ISI [1999] und TILLMANN [2006] empfohlen, erfolgten die Kalibrationsberechnungen unter Berücksichtigung der optischen Daten aller 8 nm. Der Verzicht auf die Verwendung aller gemessenen Datenpunkte (2 nm-Abstand) bedeutet keinen wesentlichen Informationsverlust, da die Absorptionen an benachbarten Wellenlängen hoch korreliert sind (Multikollinearität der Spektren) [TILLMANN 2006]. Bilden transformierte Spektren den Ausgangspunkt für die Faktorzerlegung, findet die Transformation vorab unter Beachtung aller Datenpunkte des Spektrums statt [FOSS 2007].



## 2.3 ERGEBNISSE

Auf Grund des in der Nahinfrarotspektroskopie anzuwendenden Prinzips des systematischen Ausprobierens („*trial and error*“) [ISI 1999, WILLIAMS 2004] wurden für die Fettsäureparameter in Rindfleisch 21 Kalibrationsmodelle getestet. Bei Schweinefleisch kamen 34 Kombinationen der Kalibrationsoptionen (Wellenlängenbereich, Ableitung, Streulichtkorrektur) zum Einsatz.

Die in diesem Kapitel dargestellten Tabellen enthalten die Kalibrationsstatistiken der jeweils besten Kalibrierung für einen Parameter. Als Auswahlkriterium für die „beste“ Kalibrierung wurde der SEP heran gezogen: Die Kalibrierung, die die Vorhersage eines Parameters mit dem geringsten Fehler ermöglichte, wurde angegeben.

Die Entscheidung, welche Kalibrierungen sich zur Generierung von phänotypischen Daten im Rahmen des FUGATO-Projektes QuaLIPID eignen, wurde anhand des Bestimmtheitsmaßes der Kalibrierung ( $RSQ_{cal}$ ) und des RPDs getroffen. Nach WILLIAMS [2004] sind NIRS-Kalibrierungen mit einem  $RSQ_{cal} \geq 0,83$  für die meisten Anwendungen einsetzbar. Der RPD sollte  $> 5$ , bei Parametern mit geringer Variabilität jedoch bei mindestens 3 liegen. BARLOCCO et al. [2006] und SIERRA et al. [2008] geben als Grenzwert für eine gute Kalibrierung einen RPD von 2 an.

In der vorliegenden Arbeit wurden Kalibrierungen, die ein  $RSQ_{cal} \geq 0,83$  und/oder ein  $RPD \geq 2$  aufwiesen zur Anwendung ausgewählt. Bedingt durch die Aufgabenstellung im QuaLIPID-Projekt kamen in Ausnahmefällen auch Kalibrierungen zum Einsatz, die diese Grenzen nicht einhielten. Da in QuaLIPID die NIRS-Daten die Identifizierung von Individuen mit einer genetischen Veranlagung zur Ausprägung fettstoffwechselrelevanter Merkmale im Extrembereich ermöglichen sollten, war eine dem Referenzverfahren entsprechende Genauigkeit nicht zwingend erforderlich. Einen Überblick über die anwendbaren Kalibrierungen bietet Tabelle 2-13.

### 2.3.1 NIRS-KALIBRIERUNGEN FÜR RINDFLEISCH

#### 2.3.1.1 NIRS-Kalibrierungen für relative Fettsäureparameter

Die durchschnittliche Fettsäurezusammensetzung der Rindfleischproben in den

Datensätzen für die Entwicklung der NIRS-Kalibrierungen für relative Fettsäureparameter ist in Tabelle 2-5 dargestellt. Die Zusammensetzung im Val-Set unterscheidet sich kaum von der des Cal-Sets. Die Validierproben spiegeln die in der Kalibrierung eingesetzten Proben sehr gut wider und erfüllen somit eine wichtige Voraussetzung für eine erfolgreiche Kalibrationsentwicklung.

Trotz dieser optimalen Bedingungen war die Entwicklung der Kalibrierungen für relative Fettsäureparameter in Rindfleisch nur mehr oder weniger erfolgreich (Tab. 2-6). Auffällig ist, dass Einzelfettsäuren mit mehr als einer Doppelbindung bessere Kalibrationsstatistiken aufwiesen als Verbindungen mit nur einer bzw. ohne Doppelbindung. Obwohl verschiedenste Modelle angewendet wurden (vgl. Abschnitt 2.2.4.3), ergaben sich selbst für die Fettsäuren, die in Rindfleisch den zweit- und drittgrößten Anteil an der Fettsäurezusammensetzung ausmachen – Palmitin- (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) – ungünstige Kalibrationsstatistiken, die eine Anwendung der Kalibrierungen nicht rechtfertigten. Lediglich für die Majorfettsäure in Rindfleisch, die einfach ungesättigte Ölsäure (C18:1 c9), wurde eine gute Kalibrierung erzielt ( $RSQ_{cal} = 0,831$ ).

Dieser Sachverhalt wird auch bei den Kalibrierungen für Summenparameter deutlich: Im Gegensatz zu der Summe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) ergab sich für die Summe der gesättigten Fettsäuren (SFA) keine Kalibrierung mit einem  $RSQ_{cal} \geq 0,83$ . Da der RPD jedoch bei  $> 2$  lag, kam die Kalibrierung in der vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

Bei der Kalibrierung für Eicosapentaensäure (EPA, C20:5 c5,8,11,14,17) wurde von einem Einsatz im Rahmen des QuaLIPID-Projektes abgesehen, obwohl die Kalibrationsstatistik den Vorgaben entsprach. Der Parameter fand keine Berücksichtigung, da er nur in äußerst geringem Umfang (Mittelwert (MW) Cal-Set:  $0,07 \pm 0,04$  %) in den untersuchten Proben enthalten war.

Im Gegensatz dazu wurde die Kalibrierung für Di-homo- $\gamma$ -Linolensäure (C20:3 c8,11,14) zum Einsatz im Projekt ausgewählt, obwohl  $RSQ_{cal}$  und RPD nicht den Kriterien entsprachen. Da die Kennzahlen der Kalibrierung die Grenzwerte jedoch nur knapp unterschritten ( $RSQ_{cal} = 0,811$  und  $RPD = 1,92$ ), die grafische Darstellung von Kalibrierung und Validierung (s. Anhang) eine zufrieden stellende Leistungsfähigkeit der Kalibrierung erwarten ließ und der Parameter einen etwas höheren Anteil (MW Cal-Set:  $0,37 \pm 0,16$  %) ausmachte, wurde Di-homo- $\gamma$ -Linolensäure in die Auswahl einbezogen. In Tabelle 2-13 ist diese, ausschließlich im Rahmen des Projektes einzusetzende Kalibrierung in Klammern dargestellt.

**Tab. 2-5:** relative Fettsäurezusammensetzung (% FAME) von Rindfleisch (*M. long. dorsi*) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung

	Kalibrierproben (n = 96)				Validierproben (n = 36)			
	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>
<i>Einzelfettsäuren</i>								
C14:0	2,42	0,48	1,56	3,93	2,52	0,50	1,59	3,57
C14:1c9	0,40	0,17	0,18	1,10	0,39	0,17	0,21	0,86
C15:0	0,30	0,06	0,14	0,51	0,28	0,04	0,19	0,34
C16:0	25,87	1,94	21,24	32,01	26,33	1,77	22,52	29,97
C16:1t9	0,10	0,05	0,02	0,37	0,10	0,04	0,03	0,19
C16:1c9	2,62	0,61	1,56	4,54	2,82	0,64	1,70	4,50
C17:0	0,91	0,13	0,57	1,30	0,86	0,10	0,66	1,15
C18:0	17,81	2,04	13,54	22,73	17,49	1,86	13,07	20,54
Σ C18:1trans <sup>a</sup>	2,19	0,52	1,00	4,38	2,05	0,38	1,17	2,71
C18:1c9	35,32	3,44	27,66	44,14	35,95	2,69	28,51	40,70
C18:1c11	1,99	0,25	1,55	3,00	1,94	0,25	1,56	2,67
C18:2 c9,12	5,63	2,67	1,32	13,01	5,14	2,15	1,75	10,55
CLA c9 t11	0,44	0,12	0,26	1,02	0,42	0,08	0,26	0,56
C18:3 c6,9,12	0,03	0,02	0,00	0,11	0,03	0,01	0,00	0,05
C18:3 c9,12,15	0,38	0,15	0,14	1,02	0,35	0,11	0,15	0,56
C20:0	0,11	0,02	0,06	0,18	0,11	0,02	0,07	0,14
C20:1 c11	0,15	0,04	0,09	0,31	0,16	0,03	0,08	0,22
C20:2 c11,14	0,05	0,02	0,02	0,11	0,05	0,02	0,00	0,10
C20:3 c8,11,14	0,37	0,16	0,11	0,88	0,33	0,10	0,16	0,59
C20:4 c5,8,11,14	1,57	0,74	0,31	3,99	1,43	0,56	0,51	2,94
C20:5 c5,8,11,14,17	0,07	0,04	0,00	0,18	0,06	0,03	0,00	0,12
C22:4 c7,10,13,16	0,51	0,21	0,03	1,26	0,48	0,16	0,22	0,88
C22:5 c4,7,10,13,16	0,14	0,07	0,00	0,45	0,13	0,06	0,00	0,33
C22:5 c7,10,13,16,19	0,38	0,17	0,07	0,87	0,32	0,13	0,09	0,58
C24:1 c15	0,09	0,03	0,02	0,17	0,09	0,04	0,00	0,17
<i>Summenparameter</i>								
SFA <sup>b</sup>	47,53	2,29	41,65	53,66	47,71	2,32	42,12	52,01
MUFA <sup>c</sup>	42,86	3,76	34,79	51,64	43,52	3,27	34,88	50,30
PUFA <sup>d</sup>	9,58	4,08	3,29	20,55	8,76	3,25	3,30	17,05
Σ n-3 <sup>e</sup>	0,84	0,35	0,23	1,76	0,74	0,26	0,24	1,24
Σ n-6 <sup>f</sup>	8,30	3,80	1,81	18,36	7,60	2,99	2,67	15,45

<sup>a</sup> Integration und Auswertung der Peakflächen im Zeitraum der Retention von C18:1t6 bis C18:1t11 als Summe C18:1trans

<sup>b</sup> Summe gesättigte FS (C10:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0)

<sup>c</sup> Summe einfach ungesättigte FS (C14:1 c9 + C16:1 t9 + C16:1 c9 + Σ C18:1trans + C18:1 c9 + C18:1 c11 + C20:1 c11 + C22:1 c13 + C24:1 c15)

<sup>d</sup> Summe mehrfach ungesättigte FS (C18:2 c9,12 + CLA c9t11 + C18:3 c6,9,12 + C18:3 c9,12,15 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:4 c5,8,11,14 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>e</sup> Summe omega-3-FS (C18:3 c9,12,15 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>f</sup> Summe omega-6-FS (C18:2 c9,12 + C18:3 c6,9,12 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:4 c5,8,11,14 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16)

**Tab. 2-6:** Kalibrationsstatistik für relative Fettsäureparameter in Rindfleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-5)

	N	Wellenlängen- bereich (nm)	Scatter Correction	Ableitung	Terms	SEC	RSQ <sub>cal</sub>	SECV	1-VR	SEP	RSQ <sub>val</sub>	bias	Slope	RPD	SEL
<i>Einzelfettsäuren</i>															
C14:0	95	800-2500	SNV+DT	3-5-5-1	1	0,417	0,184	0,424	0,169	0,439	0,351	0,125	2,061	1,13	0,027
C14:1c9	93	1108-1850	SNV+DT	2-6-4-1	2	0,120	0,422	0,124	0,396	0,121	0,532	-0,004	1,450	1,40	0,025
C15:0	93	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	2	0,042	0,364	0,044	0,302	0,036	0,196	-0,002	0,807	1,13	0,005
C16:0	94	1100-2500	SNV+DT	1-4-4-1	2	1,420	0,413	1,528	0,325	1,290	0,510	0,211	1,406	1,37	0,136
C16:1t9	93	800-2500	SNV+DT	1-4-4-1	2	0,030	0,593	0,032	0,556	0,022	0,721	0,006	1,325	1,75	0,006
C16:1c9	92	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	2	0,416	0,363	0,437	0,319	0,530	0,502	0,196	1,940	1,20	0,015
C17:0	90	1108-2230	SNV+DT	3-5-5-1	1	0,089	0,274	0,096	0,146	0,097	0,117	-0,012	1,067	1,07	0,013
C18:0	93	1108-1850	SNV+DT	2-6-4-1	4	1,285	0,582	1,551	0,403	1,374	0,446	0,141	1,087	1,35	0,168
Σ C18:1 <i>trans</i>	94	400-2500	SNV+DT	3-5-5-1	1	0,434	0,111	0,474	-0,055	0,361	0,124	-0,077	1,510	1,05	0,019
C18:1c9	94	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	9	1,380	0,831	1,745	0,739	1,452	0,707	0,161	0,936	1,85	0,214
C18:1c11	95	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	9	0,147	0,598	0,200	0,271	0,179	0,470	0,027	0,975	1,38	0,033
C18:2 c9,12	90	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	8	0,824	0,884	1,006	0,832	0,815	0,863	0,150	1,091	2,64	0,108
CLA c9 t11	92	800-2500	SNV+DT	2-6-4-1	1	0,075	0,225	0,096	-0,279	0,074	0,082	0,005	1,010	1,05	0,006
C18:3 c6,9,12	94	1100-2500	SNV+DT	1-4-4-1	2	0,010	0,643	0,011	0,604	0,009	0,639	0,001	1,037	1,59	0,003
C18:3 c9,12,15	92	800-2000	SNV+DT	2-6-4-1	4	0,065	0,741	0,078	0,642	0,054	0,747	-0,001	1,063	2,01	0,006
C20:0	92	1108-1850	SNV+DT	3-5-5-1	1	0,018	0,301	0,018	0,299	0,016	0,473	-0,002	1,653	1,31	0,003
C20:1 c11	93	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	2	0,029	0,285	0,030	0,248	0,026	0,144	0,005	0,719	1,07	0,003
C20:2 c11,14	93	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	2	0,013	0,649	0,013	0,638	0,012	0,659	0,003	1,223	1,59	0,004
C20:3 c8,11,14	90	1108-1850	SNV+DT	2-6-4-1	4	0,058	0,811	0,069	0,740	0,054	0,788	-0,018	0,833	1,92	0,009
C20:4 c5,8,11,14	91	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	5	0,226	0,883	0,255	0,855	0,217	0,855	-0,024	1,081	2,60	0,021
C20:5 c5,8,11,14,17	91	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	7	0,012	0,856	0,015	0,796	0,012	0,833	0,004	0,953	2,43	0,003
C22:4 c7,10,13,16	90	1100-2500	SNV+DT	3-5-5-1	3	0,069	0,860	0,083	0,803	0,069	0,802	0,002	1,084	2,25	0,019
C22:5 c4,7,10,13,16	92	1108-2230	SNV+DT	1-4-4-1	2	0,036	0,662	0,039	0,617	0,038	0,623	-0,006	1,259	1,59	0,006
C22:5 c7,10,13,16,19	89	800-2000	SNV+DT	2-6-4-1	3	0,062	0,833	0,073	0,782	0,058	0,812	-0,020	1,015	2,19	0,017
C24:1 c15	92	1100-2500	SNV+DT	1-4-4-1	2	0,018	0,533	0,020	0,464	0,032	0,330	0,001	1,478	1,21	0,034
<i>Summenparameter</i>															
SFA	92	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	8	1,124	0,742	1,311	0,650	1,148	0,767	-0,300	1,044	2,02	0,331
MUFA	94	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	9	1,266	0,883	1,671	0,805	1,371	0,836	0,059	1,158	2,39	0,290
PUFA	90	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	5	1,334	0,858	1,461	0,836	1,157	0,891	-0,199	1,163	2,81	0,152
Σ n-3	90	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	7	0,116	0,869	0,137	0,823	0,091	0,883	-0,002	0,930	2,90	0,015
Σ n-6	89	400-2500	SNV+DT	1-4-4-1	6	0,904	0,925	1,278	0,856	1,164	0,867	-0,438	1,032	2,57	0,145

### 2.3.1.2 NIRS-Kalibrierungen für absolute Fettsäureparameter

Die Gegenüberstellung der Datensätze (Tab. 2-7) zeigt deutlich, dass auch bei absoluten Daten ähnliche Fettsäuregehalte in Kalibrier- und Validierproben gegeben waren. Das Val-Set ist somit zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Kalibrierungen, die anhand der Proben im Cal-Set entwickelt wurden, geeignet.

Die Kalibration absoluter Parameter in Rindfleisch verlief, ähnlich wie bei den relativen Daten, mit unterschiedlichem Erfolg (Tab. 2-8). Im Gegensatz zu den Kalibrierungen für relative Parameter zeigten hier jedoch Fettsäuren ohne bzw. mit maximal einer Doppelbindung sehr gute Ergebnisse. Vor allem für die drei Hauptfettsäuren in Rindfleisch – Ölsäure (C18:1 c9), Palmitin- (C16:0) und Stearinsäure (C18:0) – konnten hervorragende Kalibrierungen mit  $RSQ_{cal} > 0,98$  entwickelt werden. Die Kalibrierungen für Ölsäure und Palmitinsäure erreichten dabei außerdem sehr gute RPD-Werte von 8,99 und 7,26.

Diese Tendenz setzte sich auch bei den Summenparametern fort: Die Summen der gesättigten bzw. einfach ungesättigten Fettsäuren konnten mit  $RSQ_{cal} > 0,99$  und  $RPD > 8$  äußerst erfolgreich kalibriert werden. Im Gegensatz dazu ergaben sich weder für die Summe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren, noch für die Summen der omega-3- bzw. omega-6-Fettsäuren Kalibrierungen, die den Auswahlkriterien entsprachen.

Bei der Auswahl der im Rahmen von QuaLIPID anzuwendenden Kalibrierungen fanden die Parameter Arachinsäure (20:0), Gondosäure (20:1 c11) und Nervonsäure (24:1 c15) keine Berücksichtigung. Obwohl sie ein  $RSQ_{cal} > 0,83$  aufwiesen, wurde bei diese Fettsäuren auf Grund ihrer zu geringen Gehalte ( $< 4$  mg/100 g) von einem Einsatz der Kalibrierungen abgesehen.

Weiterhin wurden Pentadecansäure (C15:0) und Margarinsäure (C17:0) trotz guter Kalibrationsstatistiken ausgeschlossen. Bei diesen ungeradzahligen Fettsäuren handelt es sich nicht um physiologische Verbindungen, sondern um Fermentationsprodukte, die von den Pansenmikroorganismen gebildet werden. Für das Anliegen von QuaLIPID waren diese Parameter irrelevant.

Für die mehrfach ungesättigten Fettsäuren  $\alpha$ -Linolensäure (C18:3 c9,12,15) und Adrensäure (C22:4 c7,10,13,16) resultierten keine Kalibrierungen, die den Vorgaben entsprachen ( $RSQ_{cal} < 0,63$  und  $RPD < 1,5$ ). Da die Grafiken der Kalibrierung und Validierung (s. Anhang) eine der Fragestellung im Projekt genügende Leistungsfähigkeit erwarten ließen, wurden die beiden Parameter dennoch in die Auswahl aufgenommen.

Die bei FOSS [2007] und TILLMANN [2006] angegebene Faustregel, dass der Fehler (SEP) einer guten Kalibrierung das Doppelte des Laborfehlers (SEL) nicht überschreiten sollte, trifft bei den Kalibrierungen für Palmitinsäure, Ölsäure, SFA und MUFA zu.

**Tab. 2-7:** absolute Fettsäurezusammensetzung (mg FS/100 g Fleisch) von Rindfleisch (*M. long. dors*) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung

	Kalibrierproben (n = 96)				Validierproben (n = 36)			
	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>
<i>Einzelfettsäuren</i>								
C14:0	56,61	40,33	10,30	190,70	57,48	35,25	15,40	167,23
C14:1c9	10,09	9,71	1,56	44,43	9,72	9,17	2,10	46,57
C15:0	6,37	3,86	1,73	25,54	5,77	2,20	2,50	10,88
C16:0	595,47	375,35	141,45	1914,84	589,07	303,01	220,14	1591,01
C16:1t9	1,76	0,61	0,53	4,94	1,78	0,39	0,84	2,61
C16:1c9	62,25	48,33	14,43	245,80	65,52	45,47	15,92	209,84
C17:0	20,23	12,09	5,36	70,38	18,59	7,77	7,89	36,31
C18:0	394,22	215,31	115,96	1212,12	376,92	149,48	164,31	785,16
Σ C18:1trans <sup>a</sup>	48,53	27,59	6,70	144,68	44,20	19,48	20,30	94,13
C18:1c9	835,61	581,15	208,53	3136,30	813,61	437,64	273,86	2258,33
C18:1c11	43,98	27,63	18,01	168,20	42,76	23,00	18,96	116,08
C18:2 c9,12	99,91	16,98	69,89	140,38	97,25	13,33	58,34	124,49
CLA c9 t11	10,30	8,52	2,37	55,99	9,34	4,54	3,49	21,91
C18:3 c6,9,12	0,45	0,31	0,00	1,29	0,55	0,26	0,00	1,04
C18:3 c9,12,15	7,73	6,68	3,51	57,29	6,80	1,40	3,41	10,59
C20:0	2,32	1,10	0,70	5,90	2,26	0,74	1,17	4,21
C20:1 c11	3,72	3,33	0,82	23,11	3,64	2,12	1,06	11,12
C20:2 c11,14	0,90	0,31	0,00	1,45	0,95	0,32	0,00	1,56
C20:3 c8,11,14	6,81	1,77	3,63	12,61	6,58	1,59	4,31	10,66
C20:4 c5,8,11,14	27,34	2,87	17,64	34,37	26,96	2,99	21,64	36,87
C20:5 c5,8,11,14,17	1,16	1,18	0,00	9,53	1,00	0,37	0,00	1,75
C22:4 c7,10,13,16	9,15	2,11	1,76	15,16	9,23	1,65	7,08	12,91
C22:5 c4,7,10,13,16	2,47	0,67	0,79	4,02	2,37	0,52	1,48	3,48
C22:5 c7,10,13,16,19	6,83	3,32	4,13	29,75	5,88	0,84	4,36	7,90
C24:1 c15	2,17	1,75	0,18	7,15	2,21	1,83	0,00	8,22
<i>Summenparameter</i>								
SFA <sup>b</sup>	1077,49	641,41	277,99	3382,71	1052,54	492,32	412,52	2599,71
MUFA <sup>c</sup>	1008,15	692,94	252,53	3738,20	983,65	533,08	334,15	2738,31
PUFA <sup>d</sup>	173,23	25,79	124,48	258,42	167,05	18,57	118,73	208,09
Σ n-3 <sup>e</sup>	15,90	11,15	9,05	98,29	13,81	1,96	9,31	17,80
Σ n-6 <sup>f</sup>	147,03	19,26	104,14	195,39	143,90	14,48	104,51	169,85

<sup>a</sup> Integration und Auswertung der Peakflächen im Zeitraum der Retention von C18:1t6 bis C18:1t11 als Summe C18:1trans

<sup>b</sup> Summe gesättigte FS (C10:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0)

<sup>c</sup> Summe einfach ungesättigte FS (C14:1 c9 + C16:1 t9 + C16:1 c9 + Σ C18:1trans + C18:1 c9 + C18:1 c11 + C20:1 c11 + C22:1 c13 + C24:1 c15)

<sup>d</sup> Summe mehrfach ungesättigte FS (C18:2 c9,12 + CLA c9t11 + C18:3 c6,9,12 + C18:3 c9,12,15 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:4 c5,8,11,14 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>e</sup> Summe omega-3-FS (C18:3 c9,12,15 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>f</sup> Summe omega-6-FS (C18:2 c9,12 + C18:3 c6,9,12 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:4 c5,8,11,14 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16)

**Tab. 2-8:** Kalibrationsstatistik für absolute Fettsäureparameter in Rindfleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-7)

	N	Wellenlängen- bereich (nm)	Scatter Correction	Ableitung	Terms	SEC	RSQ <sub>cal</sub>	SECV	1-VR	SEP	RSQ <sub>val</sub>	bias	Slope	RPD	SEL
<i>Einzelfettsäuren</i>															
C14:0	90	1108 - 1850	SNV+DT	2-6-4-1	2	9,714	0,934	10,145	0,931	9,156	0,934	0,799	1,059	3,85	2,526
C14:1c9	88	800 - 2000	SNV+DT	3-5-5-1	3	2,712	0,871	3,105	0,835	3,587	0,865	0,213	1,186	2,56	0,450
C15:0	89	1108 - 2230	SNV+DT	1-4-4-1	3	1,008	0,851	1,077	0,834	0,867	0,854	-0,248	0,966	2,53	0,232
C16:0	91	800 - 2000	SNV+DT	1-4-4-1	5	36,222	0,989	41,104	0,986	41,737	0,982	-2,965	1,039	7,26	22,916
C16:1t9	92	400 - 2500	SNV+DT	1-4-4-1	1	0,412	0,109	0,435	0,003	0,373	0,195	0,152	1,408	1,04	0,110
C16:1c9	90	800 - 2000	SNV+DT	2-6-4-1	3	9,037	0,962	10,027	0,954	14,825	0,935	3,117	1,260	3,07	2,257
C17:0	89	div. Intervalle <sup>a</sup>	SNV+DT	2-6-4-1	5	2,067	0,953	2,608	0,929	3,094	0,857	-0,285	0,871	2,51	0,809
C18:0	93	1108 - 2230	SNV+DT	3-5-5-1	4	28,511	0,981	38,536	0,965	39,471	0,950	-2,046	0,870	3,79	17,546
Σ C18:1trans	91	800 - 2000	SNV+DT	2-6-4-1	3	9,117	0,849	9,875	0,828	10,275	0,729	-2,049	0,933	1,90	1,923
C18:1c9	92	1108 - 1850	SNV+DT	1-5-5-1	9	38,978	0,995	48,370	0,993	48,658	0,990	-12,424	0,959	8,99	29,392
C18:1c11	91	1108 - 1850	SNV+DT	1-5-5-1	8	3,292	0,981	3,892	0,975	4,559	0,968	0,127	1,100	5,04	1,265
C18:2 c9,12	96	400 - 2500	SNV+DT	3-5-5-1	1	15,861	0,127	16,909	0,008	13,098	0,039	-1,471	0,585	1,02	2,658
CLA c9 t11	90	800 - 2000	SNV+DT	3-5-5-1	3	1,752	0,877	1,934	0,857	2,136	0,773	-0,102	0,964	2,12	0,388
C18:3 c6,9,12	94	div. Intervalle <sup>a</sup>	SNV+DT	1-4-4-1	1	0,250	0,277	0,258	0,260	0,259	0,327	0,165	-0,985	1,01	0,069
C18:3 c9,12,15	92	1108 - 1850	SNV+DT	1-5-5-1	8	1,085	0,571	1,317	0,377	1,119	0,423	0,322	0,809	1,25	0,301
C20:0	93	1108 - 2230	SNV+DT	3-5-5-1	3	0,360	0,873	0,415	0,835	0,373	0,772	-0,089	0,866	1,99	0,146
C20:1 c11	89	800 - 2500	SNV+DT	1-4-4-1	3	0,754	0,890	0,848	0,867	0,523	0,939	0,076	0,997	4,06	0,177
C20:2 c11,14	91	800 - 2000	SNV+DT	3-5-5-1	1	0,198	0,298	0,202	0,272	0,204	0,294	0,072	1,285	1,58	0,107
C20:3 c8,11,14	90	1108 - 1850	SNV+DT	3-5-5-1	2	1,101	0,430	1,148	0,392	1,166	0,475	-0,051	1,337	1,36	0,171
C20:4 c5,8,11,14	93	1108 - 1850	SNV+DT	3-5-5-1	1	2,360	0,103	2,364	0,095	2,792	0,150	-0,365	1,800	1,07	0,636
C20:5 c5,8,11,14,17	91	800 - 2500	SNV+DT	1-4-4-1	3	0,201	0,631	0,226	0,543	0,226	0,063	0,013	0,354	1,63	0,066
C22:4 c7,10,13,16	90	1108 - 1850	SNV+DT	2-6-4-1	2	1,067	0,625	1,118	0,594	1,117	0,532	-0,098	0,957	1,48	0,254
C22:5 c4,7,10,13,16	92	1108 - 2230	SNV+DT	1-4-4-1	1	0,565	0,166	0,576	0,154	0,525	0,045	-0,147	0,586	0,98	0,192
C22:5 c7,10,13,16,19	94	1108 - 2230	SNV+DT	2-6-4-1	6	0,622	0,577	0,892	0,135	0,862	0,130	-0,305	0,557	0,97	0,276
C24:1 c15	90	1108 - 1850	SNV+DT	2-6-4-1	2	0,378	0,946	0,403	0,940	0,832	0,810	0,076	1,205	2,20	1,394
<i>Summenparameter</i>															
SFA	92	800 - 2000	SNV+DT	3-5-5-1	7	49,791	0,994	60,725	0,991	59,096	0,986	-13,290	0,979	8,33	44,080
MUFA	91	1108 - 1850	SNV+DT	1-5-5-1	9	37,300	0,997	46,795	0,995	51,711	0,991	-14,770	0,987	10,31	35,073
PUFA	95	800 - 2000	SNV+DT	3-5-5-1	1	19,932	0,331	20,374	0,297	16,541	0,251	-4,664	0,917	1,12	4,622
Σ n-3	92	1108 - 2230	SNV+DT	2-6-4-1	1	1,760	0,232	1,792	0,208	1,906	0,035	-0,349	0,535	1,03	0,778
Σ n-6	93	400 - 2500	SNV+DT	1-4-4-1	5	11,363	0,613	15,490	0,278	13,79	0,183	-1,518	0,569	1,05	3,686

<sup>a</sup> 1124-1160, 1284-1366, 1470-1486, 1510-1576, 1730-1740, 1794-1820, 1940-2220

## **2.3.2 NIRS-KALIBRIERUNGEN FÜR SCHWEINEFLEISCH**

### **2.3.2.1 NIRS-Kalibrierungen für relative Fettsäureparameter**

Tabelle 2-9 ist die prozentuale Fettsäurezusammensetzung der Proben für die Entwicklung von NIRS-Kalibrierungen in Schweinefleisch zu entnehmen. Die für die Kalibration verwendeten Proben werden durch das Val-Set sehr gut widergespiegelt. Diese Voraussetzung für eine erfolgreiche Kalibrationsentwicklung ist somit gegeben.

Für die relativen Fettsäureparameter in Schweinefleisch ergaben sich mit Ausnahme von Arachidonsäure (C20:4 c5,8,11,14) und der Summe der omega-6-Fettsäuren ( $\Sigma n-6$ ) keine Kalibrationsstatistiken, die den Auswahlkriterien entsprachen (Tab. 2-10). Außer bei diesen beiden Parametern erreichte keine Kalibrierung ein  $RSQ_{cal} \geq 0,83$ . Ein RPD-Wert  $\geq 2$  trat bei keiner Kalibrierung auf.

Da die Kalibrierungen genutzt werden sollten, um Tiere phänotypisch zu charakterisieren und die Identifizierung von Individuen mit extremer genetischer Veranlagung zu ermöglichen, wurde entschieden, auch Parameter aufzunehmen, deren Kalibrierungen  $RSQ_{cal} \geq 0,8$  aufwiesen. Kalibrierungen, die diesen neuen Grenzwert erreichten, sind ausschließlich für den Einsatz im Rahmen des Projektes geeignet und in Tabelle 2-13 in Klammern dargestellt. Auffällig ist, dass – wie bei den Kalibrierungen für relative Parameter in Rindfleisch – ausschließlich Kalibrierungen für Fettsäuren bzw. Summenparameter mit mehr als einer Doppelbindung dem neuen Kriterium entsprachen.

Bei Parametern, für die sich Kalibrierungen mit einem  $RSQ_{cal}$  knapp unterhalb des neuen Grenzwertes ergaben und die einen Anteil an der Fettsäurezusammensetzung  $> 1 \%$  ausmachten, wurde geprüft, ob die graphische Darstellung von Kalibrierung und Validierung eine den Projektzwecken genügende Leistungsfähigkeit der Kalibrierung erwarten ließ. Dies war bei Ölsäure, Linolsäure, Adrensäure und der Summe der einfach ungesättigten Fettsäuren der Fall (Grafiken s. Anhang). Diese unter Vorbehalt einsetzbaren Kalibrierungen sind in Tabelle 2-13 in Klammern dargestellt.



**Tab. 2-9:** relative Fettsäurezusammensetzung (% FAME) von Schweinefleisch (*M. long. dorsi*) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung

	Kalibrierproben (n = 77)				Validierproben (n = 72)			
	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>
<i>Einzelfettsäuren</i>								
C14:0	1,14	0,18	0,58	1,51	1,17	0,18	0,80	1,58
C16:0	22,68	1,32	19,55	25,38	22,84	1,30	20,43	25,52
C16:1c9	3,04	0,49	1,40	4,29	3,18	0,51	2,20	4,39
C17:0	0,29	0,09	0,16	0,66	0,28	0,10	0,15	0,58
C18:0	11,75	1,03	9,20	14,34	11,73	1,08	9,23	14,27
Σ C18:1trans <sup>a</sup>	0,16	0,02	0,10	0,20	0,16	0,02	0,13	0,29
C18:1c9	33,76	3,60	18,93	40,41	34,99	2,57	28,82	40,60
C18:1c11	6,20	0,50	4,97	7,31	6,34	0,58	5,16	7,60
C18:2 c9,12	12,55	3,53	6,43	24,72	11,51	2,68	7,12	18,61
C18:3 c6,9,12	0,15	0,05	0,06	0,27	0,14	0,05	0,04	0,24
C18:3 c9,12,15	0,51	0,12	0,32	0,76	0,48	0,08	0,32	0,70
C20:0	0,13	0,03	0,05	0,24	0,13	0,03	0,06	0,19
C20:1 c11	0,61	0,09	0,42	0,82	0,63	0,09	0,46	0,86
C20:2 c11,14	0,33	0,09	0,18	0,72	0,31	0,07	0,20	0,57
C20:3 c8,11,14	0,47	0,13	0,23	0,86	0,44	0,12	0,24	0,78
C20:4 c5,8,11,14	3,20	1,15	1,41	8,57	2,86	0,89	1,55	5,41
C20:5 c5,8,11,14,17	0,18	0,06	0,09	0,38	0,17	0,05	0,08	0,31
C22:4 c7,10,13,16	0,91	0,31	0,40	1,94	0,82	0,23	0,42	1,38
C22:5 c4,7,10,13,16	0,17	0,07	0,06	0,44	0,16	0,06	0,06	0,31
C22:5 c7,10,13,16,19	0,84	0,32	0,39	2,41	0,75	0,23	0,37	1,33
C22:6 c4,7,10,13,16,19	0,11	0,06	0,03	0,33	0,10	0,05	0,02	0,24
C24:0	0,25	0,07	0,07	0,38	0,23	0,07	0,04	0,36
<i>Summenparameter</i>								
SFA <sup>b</sup>	36,47	2,28	31,03	41,32	36,62	2,33	31,39	41,52
MUFA <sup>c</sup>	43,84	4,29	25,97	51,56	45,38	3,23	37,55	51,69
PUFA <sup>d</sup>	19,67	5,70	10,13	41,50	17,98	4,34	10,96	29,40
Σ n-3 <sup>e</sup>	1,72	0,52	0,93	3,97	1,58	0,39	0,95	2,53
Σ n-6 <sup>f</sup>	17,78	5,18	9,06	37,38	16,24	3,96	9,85	26,82

<sup>a</sup> Integration und Auswertung der Peakflächen im Zeitraum der Retention von C18:1t6 bis C18:1t11 als Summe C18:1trans

<sup>b</sup> Summe gesättigte FS (C10:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0)

<sup>c</sup> Summe einfach ungesättigte FS (C14:1 c9 + C16:1 c9 + Σ C18:1trans + C18:1 c9 + C18:1 c11 + C20:1 c11 + C22:1 c13 + C24:1 c15)

<sup>d</sup> Summe mehrfach ungesättigte FS (C18:2 c9,12 + CLA c9t11 + CLA c9c11+ C18:3 c6,9,12 + C18:3 c9,12,15 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:3 c11,14,17 + C20:4 c5,8,11,14 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>e</sup> Summe omega-3-FS (C18:3 c9,12,15 + C20:3 c11,14,17 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>f</sup> Summe omega-6-FS (C18:2 c9,12 + C18:3 c6,9,12 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:4 c5,8,11,14 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16)

**Tab. 2-10:** Kalibrationsstatistik für relative Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-9)

	N	Wellenlängen- bereich (nm)	Scatter Correction	Ableitung	Terms	SEC	RSQ <sub>cal</sub>	SECV	1-VR	SEP	RSQ <sub>val</sub>	bias	Slope	RPD	SEL
<i>Einzelfettsäuren</i>															
C14:0	74	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	5	0,076	0,791	0,094	0,693	0,128	0,484	0,020	1,019	1,39	0,011
C16:0	74	800-2500	SNV+DT	2-6-4-1	3	0,601	0,773	0,730	0,677	0,921	0,491	-0,019	1,000	1,41	0,080
C16:1c9	74	1108-1850	SNV	0-5-5-1	2	0,372	0,185	0,374	0,173	0,467	0,310	0,120	2,186	1,10	0,012
C17:0	75	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	3	0,056	0,522	0,063	0,420	0,083	0,223	0,003	0,868	1,14	0,012
C18:0	75	400-2000	SNV+DT	3-5-5-1	3	0,620	0,623	0,787	0,398	0,981	0,196	-0,019	0,731	1,10	0,115
Σ C18:1 <i>trans</i>	73	400-2500	SNV+DT	3-5-5-1	2	0,010	0,506	0,012	0,243	0,021	0,130	-0,001	0,924	1,08	0,007
C18:1c9	71	1108-1850	DT	1-5-5-1	4	1,491	0,768	1,642	0,731	1,899	0,500	0,491	0,844	1,35	0,138
C18:1c11	75	1108-1850	ohne	0-5-5-1	1	0,407	0,296	0,422	0,248	0,502	0,295	0,102	1,523	1,15	0,019
C18:2 c9,12	74	1108-1850	ohne	2-5-5-1	3	1,615	0,746	1,849	0,683	1,656	0,630	-0,314	0,920	1,62	0,083
C18:3 c6,9,12	76	400-2500	SNV+DT	2-6-4-1	3	0,025	0,733	0,031	0,608	0,034	0,484	-0,006	1,015	1,40	0,008
C18:3 c9,12,15	75	400-2000	SNV+DT	1-4-4-1	7	0,049	0,809	0,074	0,588	0,070	0,502	-0,025	0,672	1,20	0,006
C20:0	73	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	3	0,020	0,425	0,023	0,235	0,023	0,288	-0,001	0,961	1,17	0,004
C20:1 c11	74	1108-1850	mMSC	0-5-5-1	2	0,068	0,305	0,070	0,275	0,078	0,220	0,014	1,258	1,12	0,006
C20:2 c11,14	74	1108-1850	ohne	0-5-5-1	4	0,059	0,266	0,063	0,184	0,066	0,129	-0,007	0,969	1,08	0,032
C20:3 c8,11,14	70	1108-1850	SNV+DT	0-5-5-1	4	0,052	0,811	0,055	0,802	0,070	0,673	-0,015	1,084	1,72	0,012
C20:4 c5,8,11,14	73	1108-1850	mMSC	0-5-5-1	5	0,375	0,841	0,416	0,817	0,522	0,630	-0,118	0,973	1,71	0,068
C20:5 c5,8,11,14,17	75	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	4	0,022	0,811	0,026	0,761	0,028	0,667	-0,004	0,989	1,71	0,007
C22:4 c7,10,13,16	73	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	4	0,123	0,798	0,149	0,722	0,157	0,585	-0,046	0,839	1,46	0,012
C22:5 c4,7,10,13,16	71	1108-1850	ohne	0-20-10-1	6	0,027	0,721	0,028	0,696	0,044	0,406	-0,005	0,956	1,31	0,014
C22:5 c7,10,13,16,19	72	400-2000	SNV+DT	2-6-4-1	3	0,108	0,818	0,123	0,779	0,145	0,600	-0,027	0,937	1,56	0,010
C22:6 c4,7,10,13,16,19	73	1108-1850	SNV	0-5-5-1	6	0,029	0,552	0,032	0,472	0,042	0,264	0,002	0,937	1,19	0,005
C24:0	76	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	1	0,059	0,149	0,061	0,109	0,075	0,000	-0,023	0,073	0,94	0,029
<i>Summenparameter</i>															
SFA	76	1108-1850	SNV+DT	2-6-4-1	3	1,346	0,626	1,511	0,549	1,768	0,420	-0,122	1,044	1,32	0,085
MUFA	73	1108-1850	mMSC	0-5-5-1	5	2,057	0,694	2,201	0,664	2,315	0,533	0,725	0,921	1,39	0,167
PUFA	72	400-2000	SNV+DT	2-6-4-1	3	2,098	0,822	2,355	0,787	2,645	0,643	-0,570	0,944	1,64	0,171
Σ n-3	74	800-2500	SNV+DT	2-6-4-1	3	0,193	0,816	0,244	0,727	0,243	0,610	-0,023	0,907	1,59	0,012
Σ n-6	72	800-2500	SNV+DT	2-6-4-1	3	1,782	0,838	2,167	0,769	2,36	0,643	-0,199	0,973	1,68	0,170

### 2.3.2.2 NIRS-Kalibrierungen für absolute Fettsäureparameter

Die Gegenüberstellung von Cal- und Val-Set in Tabelle 2-11 macht deutlich, dass auch im Fall der absoluten Fettsäuredaten in Schweinefleisch die Validierproben das Cal-Set gut repräsentieren. Auffällig ist, dass die Mittelwerte der gesättigten und einfach ungesättigten Parameter im Val-Set etwas höher und die Streubereiche etwas enger sind als bei den Kalibrierproben. Die Ursache hierfür liegt in der Tatsache, dass für die erfolgreiche Entwicklung von Kalibrierungen ein möglichst großer Variationsbereich des zu kalibrierenden Parameters erforderlich ist. Aus diesem Grund sind Proben, die einen sehr niedrigen intramuskulären Fettgehalt und damit auch niedrige Gehalte an den erwähnten Fettsäuren aufwiesen, bevorzugt im Cal-Set enthalten. Dadurch vergrößern sich die Streubereiche in den Kalibrierproben und die Mittelwerte verschieben sich etwas in Richtung der geringeren Gehalte.

Die Kalibrationsentwicklung für absolute Parameter verlief in Schweinefleisch ähnlich wie in Rindfleisch: Ausschließlich Fettsäuren ohne bzw. mit maximal einer Doppelbindung erreichten Kennzahlen, die den Vorgaben entsprachen (Tab. 2-12). Dabei wurden für Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0), Ölsäure (C18:1 c9) und *cis*-Vaccensäure (C18:1 c11) hervorragende Kalibrierungen mit  $RSQ_{cal} > 0,95$  und RPD-Werten  $> 3$  erzielt. Die Kalibrationsstatistik für den mehrfach ungesättigten Parameter Linolsäure (C18:2 9,12), der mit 133 mg/100 g Muskel in einer ähnlichen Größenordnung in dem Probenmaterial enthalten war, wie die mit sehr gutem Ergebnis kalibrierte Stearinsäure, erfüllte nicht die Anforderungen.

Bei den Summenparametern zeigte sich das gleiche Bild: Die Kalibrierungen für die Summen der gesättigten (SFA) und einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) wiesen mit  $RSQ_{cal} > 0,97$  und RPD-Werten  $> 4,40$  sehr gute Kalibrationsstatistiken auf. Für die Summe der mehrfach ungesättigten Fettsäuren und auch für die Summen der omega-3- bzw. omega-6-Fettsäuren ergaben sich keine Kalibrierungen, die den Auswahlkriterien entsprachen.

Dem Anspruch, dass der SEP einer guten Kalibrierung das Doppelte des Laborfehlers (SEL) nicht überschreitet, genügte keine Kalibrierung.

Von dem Einsatz der Kalibrierung für die Summe der Octadecenfettsäuren mit Doppelbindungen in *trans*-Konfiguration ( $\Sigma 18:1 \text{ trans}$ ) wurde trotz guter Kalibrationsstatistik abgesehen, da diese Fettsäuregruppe beim Schwein nur in geringen Mengen vorkommt. Im Gegensatz zum Rind verfügen Monogastrier wie Schweine über

keinen Pansen, dessen Mikroflora *trans*-Doppelbindungen in Fettsäuren in größerem Umfang synthetisieren kann [DUGAN et al. 2004]. Aus diesem Grund spielt beim Schwein auch die nur in geringen Mengen gebildete *trans*-Vaccensäure (C18:1 t11) als Ausgangsstoff für die endogene Synthese des *cis*-9, *trans*-11-Isomers der konjugierten Linolsäure (CLA c9 t11) [GLÄSER et al. 2000] keine Rolle.

**Tab. 2-11:** absolute Fettsäurezusammensetzung (mg FS/100 g Fleisch) von Schweinefleisch (*M. long. dorsi*) in den Datensätzen für die NIRS-Kalibrationsentwicklung

	Kalibrierproben (n = 77)				Validierproben (n = 72)			
	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>	X	S	X <sub>min</sub>	X <sub>max</sub>
<i>Einzelfettsäuren</i>								
C14:0	13,35	6,44	2,92	33,44	14,17	5,55	5,02	28,24
C16:0	262,74	102,78	101,01	543,60	275,99	85,46	125,96	484,62
C16:1c9	35,42	15,77	7,18	87,99	38,58	14,37	14,20	81,80
C17:0	3,21	1,19	1,67	10,27	3,31	1,31	1,64	11,20
C18:0	136,38	53,40	59,28	268,48	141,94	43,46	68,65	273,21
Σ C18:1 <i>trans</i> <sup>a</sup>	1,80	0,66	0,49	3,70	1,89	0,59	0,91	3,81
C18:1c9	397,25	170,58	97,98	901,82	425,09	135,25	178,08	760,18
C18:1c11	70,30	26,63	25,62	152,84	75,03	22,67	34,79	141,86
C18:2 c9,12	132,91	18,07	91,60	212,14	131,92	17,34	87,07	200,81
C18:3 c6,9,12	1,55	0,36	0,75	2,91	1,58	0,39	0,50	2,56
C18:3 c9,12,15	5,49	1,06	3,59	8,56	5,59	1,06	3,73	8,85
C20:0	1,54	0,78	0,44	3,75	1,59	0,63	0,49	3,27
C20:1 c11	7,20	3,19	2,45	16,74	7,79	2,75	3,04	16,63
C20:2 c11,14	3,62	1,01	2,09	6,60	3,64	0,85	1,84	5,91
C20:3 c8,11,14	5,03	0,80	3,39	9,48	4,99	0,66	2,61	6,63
C20:4 c5,8,11,14	33,44	5,22	22,53	58,07	32,41	5,24	20,47	47,16
C20:5 c5,8,11,14,17	1,87	0,31	1,37	3,23	1,87	0,31	1,09	2,60
C22:4 c7,10,13,16	9,48	1,64	4,74	18,90	9,27	1,51	5,28	14,70
C22:5 c4,7,10,13,16	1,78	0,40	0,92	3,15	1,77	0,46	0,90	3,29
C22:5 c7,10,13,16,19	4,37	0,72	2,28	7,83	4,25	0,67	2,52	6,42
C22:6 c4,7,10,13,16,19	2,23	0,75	0,83	3,92	2,26	0,90	0,36	4,73
C24:0	2,84	1,18	0,62	6,60	2,76	1,20	0,37	6,28
<i>Summenparameter</i>								
SFA <sup>b</sup>	422,70	165,13	168,14	861,63	442,54	136,39	203,93	791,90
MUFA <sup>c</sup>	512,90	216,10	133,90	1157,44	549,40	174,13	231,18	998,94
PUFA <sup>d</sup>	204,61	26,68	138,44	337,79	202,50	25,80	132,73	297,48
Σ n-3 <sup>e</sup>	14,84	2,08	10,31	23,65	14,88	2,30	9,67	22,62
Σ n-6 <sup>f</sup>	187,80	24,42	126,64	310,54	185,57	23,40	121,40	275,34

<sup>a</sup> Integration und Auswertung der Peakflächen im Zeitraum der Retention von C18:1t6 bis C18:1t11 als Summe C18:1 *trans*

<sup>b</sup> Summe gesättigte FS (C10:0 + C12:0 + C14:0 + C15:0 + C16:0 + C17:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0)

<sup>c</sup> Summe einfach ungesättigte FS (C14:1 c9 + C16:1 c9 + Σ C18:1 *trans* + C18:1 c9 + C18:1 c11 + C20:1 c11 + C22:1 c13 + C24:1 c15)

<sup>d</sup> Summe mehrfach ungesättigte FS (C18:2 c9,12 + CLA c9t11 + CLA c9c11 + C18:3 c6,9,12 + C18:3 c9,12,15 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:3 c11,14,17 + C20:4 c5,8,11,14 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>e</sup> Summe omega-3-FS (C18:3 c9,12,15 + C20:3 c11,14,17 + C20:5 c5,8,11,14,17 + C22:5 c7,10,13,16,19 + C22:6 c4,7,10,13,16,19)

<sup>f</sup> Summe omega-6-FS (C18:2 c9,12 + C18:3 c6,9,12 + C20:2 c11,14 + C20:3 c8,11,14 + C20:4 c5,8,11,14 + C22:4 c7,10,13,16 + C22:5 c4,7,10,13,16)

**Tab. 2-12:** Kalibrationsstatistik für absolute Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Abkürzungen entspr. Tab. 2-11)

	N	Wellenlängen- bereich (nm)	Scatter Correction	Ableitung	Terms	SEC	RSQ <sub>cal</sub>	SECV	1-VR	SEP	RSQ <sub>val</sub>	bias	Slope	RPD	SEL
<i>Einzelfettsäuren</i>															
C14:0	76	1108-1850	ohne	1-5-5-1	6	1,269	0,960	1,510	0,946	1,707	0,905	0,087	1,021	3,25	0,406
C16:0	75	1108-1850	mMSC	1-5-5-1	7	11,946	0,986	15,824	0,977	16,72	0,961	1,163	0,998	5,11	6,405
C16:1c9	75	1108-1850	SNV	1-5-5-1	4	4,514	0,906	5,296	0,875	6,343	0,837	2,149	1,138	2,27	1,023
C17:0	74	800-2000	SNV+DT	2-6-4-1	4	0,519	0,524	0,644	0,276	1,140	0,298	0,197	1,552	1,15	0,176
C18:0	71	1108-1850	DT	2-5-5-1	6	6,013	0,985	9,569	0,964	14,005	0,896	1,031	0,973	3,10	3,199
Σ C18:1 <i>trans</i>	77	800-2500	SNV+DT	1-4-4-1	6	0,116	0,970	0,191	0,921	0,261	0,802	0,032	1,021	2,25	0,097
C18:1c9	75	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	6	24,052	0,980	31,929	0,966	31,869	0,948	7,150	0,957	4,24	10,966
C18:1c11	77	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	5	5,619	0,956	7,123	0,931	7,406	0,899	1,485	1,062	3,06	1,806
C18:2 c9,12	75	1108-1850	SNV+DT	2-5-5-1	2	11,254	0,466	12,075	0,386	14,476	0,304	-1,313	1,148	1,20	2,045
C18:3 c6,9,12	75	400-2000	SNV+DT	2-6-4-1	1	0,288	0,159	0,297	0,112	0,375	0,066	0,020	1,023	1,04	0,096
C18:3 c9,12,15	75	1108-1850	ohne	1-5-5-1	3	0,591	0,691	0,630	0,654	0,653	0,621	-0,041	1,125	1,62	0,108
C20:0	75	800-2000	SNV+DT	3-5-5-1	4	0,244	0,891	0,318	0,825	0,283	0,796	-0,013	1,054	2,21	0,061
C20:1 c11	76	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	5	0,793	0,939	0,969	0,912	1,048	0,856	0,161	1,006	2,62	0,207
C20:2 c11,14	77	1108-1850	mMSC	2-5-5-1	2	0,684	0,540	0,735	0,478	0,697	0,349	-0,108	0,854	1,22	0,383
C20:3 c8,11,14	75	400-2500	SNV+DT	2-6-4-1	2	0,405	0,535	0,456	0,407	0,626	0,108	-0,042	0,674	1,05	0,122
C20:4 c5,8,11,14	74	400-2500	SNV+DT	2-6-4-1	3	2,378	0,657	3,330	0,332	4,664	0,203	-0,029	0,868	1,12	0,855
C20:5 c5,8,11,14,17	75	1108-1850	DT	0-5-5-1	4	0,192	0,446	0,216	0,315	0,272	0,253	0,039	1,198	1,15	0,118
C22:4 c7,10,13,16	75	1108-1850	ohne	0-5-5-1	1	1,090	0,051	1,099	0,029	1,476	0,046	-0,148	1,576	1,02	0,142
C22:5 c4,7,10,13,16	75	400-2000	SNV+DT	1-4-4-1	1	0,327	0,174	0,338	0,131	0,446	0,031	-0,007	0,761	1,02	0,172
C22:5 c7,10,13,16,19	72	400-2000	SNV+DT	1-4-4-1	1	0,441	0,148	0,461	0,072	0,663	0,025	-0,087	0,754	1,01	0,097
C22:6 c4,7,10,13,16,19	76	400-2500	SNV+DT	2-6-4-1	1	0,711	0,117	0,783	-0,039	0,877	0,047	0,017	0,975	1,03	0,179
C24:0	73	1108-1850	SNV+DT	3-5-5-1	3	0,535	0,709	0,630	0,621	0,879	0,484	-0,155	1,195	1,36	0,436
<i>Summenparameter</i>															
SFA	73	1108-1850	mMSC	1-5-5-1	6	20,090	0,983	24,277	0,977	30,077	0,951	3,063	1,001	4,53	9,933
MUFA	75	1108-1850	SNV+DT	1-5-5-1	6	30,843	0,979	40,868	0,965	39,478	0,952	10,079	0,983	4,41	14,086
PUFA	75	1108-1850	SNV+DT	0-5-5-1	4	14,794	0,493	15,963	0,405	22,523	0,251	-3,792	1,100	1,15	3,197
Σ n-3	75	800-2000	SNV+DT	1-4-4-1	1	1,378	0,418	1,422	0,377	2,082	0,169	-0,026	1,118	1,10	0,325
Σ n-6	75	1108-1850	SNV+DT	0-5-5-1	4	13,618	0,481	14,642	0,396	20,67	0,234	-3,661	1,062	1,13	2,909

Als einzige Kalibrierung einer mehrfach ungesättigte Fettsäure in Schweinefleisch wurde diejenige für  $\alpha$ -Linolensäure (18:3 c9,12,15) zum Einsatz im Rahmen von QuaLIPID heran gezogen, obwohl das  $RSQ_{cal}$  mit 0,691 und ein RPD von 1,62 nicht den Vorgaben entsprachen. Die Grafiken der Kalibrierung und Validierung ließen jedoch eine den Ansprüchen des Projektes genügende Leistungsfähigkeit erwarten (s. Anhang). Diese ausschließlich für den Projektzweck taugliche Kalibrierung ist in Tabelle 2-13 in Klammern dargestellt.

**Tab. 2-13:** Übersicht der mit NIRS in Rind- und Schweinefleisch bestimmbaren Fettsäureparameter

Parameter	Rind		Schwein	
	%	mg/100g	%	mg/100g
Myristinsäure C14:0		x		x
Myristoleinsäure C14:1		x		
Palmitinsäure C16:0		x		x
Palmitoleinsäure C16:1		x		x
Stearinsäure C18:0		x		x
$\Sigma$ trans-Octadecensäuren $\Sigma$ C18:1 trans		x		
Ölsäure C18:1c9	x	x	(x)	x
cis-Vaccensäure C18:1c11		x		x
Linolsäure C18:2 c9,12	x		(x)	
CLA c9 t11 C18:2 c9,t11		x		
$\alpha$ -Linolensäure C18:3 c9,12,15	x	(x)	(x)	(x)
Arachinsäure C20:0				x
Gondosäure C20:1 c11				x
Di-homo- $\gamma$ -Linolensäure C20:3 c8,11,14	(x)		(x)	
Arachidonsäure C20:4 c5,8,11,14	x		x	
EPA C20:5 c5,8,11,14,17			(x)	
Adrensäure C22:4 c7,10,13,16	x	(x)	(x)	
DPA C22:5 c7,10,13,16,19	x		(x)	
gesättigte FS SFA	x	x		x
einfach ungesättigte FS MUFA	x	x	(x)	x
mehrfach ungesättigte FS PUFA	x		(x)	
omega-3-FS $\Sigma$ n-3	x		(x)	
omega-6-FS $\Sigma$ n-6	x		x	

(x) Kalibrierung nur für QuaLIPID nutzbar

## 2.4 DISKUSSION

Im Rahmen des FUGATO-Projektes QuaLIPID sollte ein auf Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) basierendes Verfahren entwickelt werden, welches die Erfassung sowohl der relativen wie auch der absoluten Fettsäurezusammensetzung in Rind- und Schweinefleisch im Hochdurchsatz ermöglicht. Dabei hebt die simultane Bearbeitung der Spezies Rind und Schwein diese Arbeit von bisher durchgeführten Studien ab [GONZALES-MARTIN et al. 2005, REALINI et al. 2004, SIERRA et al. 2008, WINDHAM AND MORRISON 1998]. Weiterhin ist die Gegenüberstellung von Kalibrierungen für relative und absolute Parameter bislang einzigartig. Soweit der Autorin bekannt ist, ist die vorliegende Untersuchung auch die erste, in der absolute Referenzdaten für die Entwicklung von Kalibrierungen für Fettsäureparameter in Schweinefleisch eingesetzt wurden.

Bei der Entwicklung von Kalibrierungen für die Vorhersage der **relativen** Fettsäurezusammensetzung in **Rindfleisch** (*M. longissimus dorsi*) zeigten sich für Parameter mit mehr als einer Doppelbindung bessere Kalibrationsstatistiken als für gesättigte Verbindungen bzw. Fettsäuren mit nur einer Doppelbindung. In den Studien von WINDHAM AND MORRISON [1998] und REALINI et al. [2004], die die Eignung von NIRS zur Vorhersage der relativen Fettsäurezusammensetzung von Rindfleisch prüften, wird dieser Sachverhalt jedoch nicht deutlich. WINDHAM AND MORRISON [1998] und REALINI et al. [2004] konzentrieren sich in ihren Untersuchungen lediglich auf Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure als Vertreter der mehrfach ungesättigten Fettsäuren. In keiner der beiden Studien ergab sich eine einsatzfähige Kalibrierung für Linolsäure. Für  $\alpha$ -Linolensäure gelang nur REALINI et al. [2004] eine gute Kalibrierung mit einem  $RSQ_{val}$  von 0,93 und einem Fehler (SEP) von 0,07 %. In der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung von Kalibrierungen für Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure mit  $RSQ_{val}$  von 0,86 und 0,75 und Fehlern von 0,82 % und 0,05 % erfolgreich möglich. Im Gegensatz zu den Studien von WINDHAM AND MORRISON [1998] und REALINI et al. [2004] wies Linolsäure in dieser Untersuchung einen größeren Streubereich auf, was als Ursache für die erfolgreichere Kalibrationsentwicklung angesehen werden kann. Für  $\alpha$ -Linolensäure zeigt sich bei REALINI et al. [2004] ein etwas weiterer Streubereich als bei WINDHAM AND MORRISON [1998]. In der vorliegenden Studie variiert dieser Parameter jedoch ähnlich wie bei WINDHAM AND MORRISON [1998]. Die dennoch bessere Kalibrierung in dieser Arbeit kann auf die zu Grunde liegenden Kalibrationsoptionen zurück geführt werden: Bei WINDHAM AND MORRISON [1998] erfolgte eine Einschränkung des Wellenlängenbereiches auf 800 -

2500 nm; es wurde jedoch keine Ableitung der Spektren durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit ergab sich die beste Kalibrierung für  $\alpha$ -Linolensäure bei einer Einschränkung des Wellenlängenbereiches auf 800 - 2000 nm und einer Anwendung der Spektren in der zweiten Ableitung.

In ihren Untersuchungen stimmen WINDHAM AND MORRISON [1998] und REALINI et al. [2004] überein, dass die Vorhersage der Summenparameter für gesättigte (SFA) und ungesättigte Fettsäuren (UFA) mit NIRS in Rindfleisch sehr gut möglich ist. In der vorliegenden Arbeit ergab sich eine Kalibrierung für SFA, die mit 0,77 das gleiche  $RSQ_{val}$  aufweist, wie bei WINDHAM AND MORRISON [1998]. Allerdings ist der Fehler mit 1,15 % minimal höher als bei diesen Autoren angegeben (1,10 %). Er liegt aber noch unter dem SEP von REALINI et al. [2004] (1,16 %). REALINI et al. [2004] erzielten für SFA ein höheres  $RSQ_{val}$  (0,87), was vermutlich auf das Probenmaterial zurück zu führen ist: REALINI et al. [2004] verwendeten mehrere Proben pro Tier, die sich hauptsächlich in der Lagerungszeit unterschieden.

Ein ähnlich hohes Bestimmtheitsmaß geben REALINI et al. [2004] auch für UFA an (0,90), welches bei WINDHAM AND MORRISON [1998] mit 0,77 deutlich niedriger ausfällt. In der vorliegenden Untersuchung wurden Kalibrierungen für die Summe ungesättigter Fettsäuren getrennt nach einfach (MUFA) und mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA) entwickelt. Dabei wurden mit 0,84 (MUFA) und 0,89 (PUFA)  $RSQ_{val}$  erreicht, die zwischen den bei WINDHAM AND MORRISON [1998] und REALINI et al. [2004] angegebenen Werten für UFA liegen. Der Fehler der PUFA-Kalibrierung bewegt sich mit 1,16 % in der Größenordnung, die auch WINDHAM AND MORRISON [1998] und REALINI et al. [2004] für UFA angeben (1,13 % und 1,18 %). Bei MUFA ist der SEP etwas höher (1,37 %).

Eine Ausnahme von der Beobachtung, dass mehrfach ungesättigte Fettsäuren unter den Kalibrierungen für relative (%) Parameter bessere Ergebnisse aufwiesen, ist das *cis*-9, *trans*-11-Isomer der konjugierten Linolsäure (CLA c9 t11). Obwohl diese Fettsäure über zwei Doppelbindungen verfügt, konnte keine Kalibrierung entwickelt werden, die den Vorgaben entsprach. Ein anderes Bild zeigte sich bei den Kalibrierungen absoluter (mg FS/100 g Muskel) Parameter. Hier fiel CLA c9 t11 als einzige mehrfach ungesättigte Fettsäure auf, die die Auswahlkriterien von  $RSQ_{cal} \geq 0,83$  und  $RPD \geq 2$  erfüllte. Die Ursache für dieses Phänomen könnte in der *trans*-Bindung liegen. Die NIR-Absorptionsbanden der Obertöne und Kombinationsschwingungen von *trans*-Bindungen sind sehr schwach und werden i.d.R. durch stärkere Absorptionen überlagert [LI et al. 1999]. Aus diesem Grund ist anzunehmen, dass hauptsächlich die Informationen der *cis*-Bindung zum Tragen kommen, wodurch CLA c9 t11 in der Nahinfrarotspektroskopie der Charakter einer einfach ungesättigten Fettsäure verliehen wird. Eine andere Erklärung



wäre die stärkere Variation dieses Parameters in dem absoluten Datensatz ( $CV^7$  absolut 0,83 und relativ 0,28). Ein möglichst breiter Streubereich ist eine wesentliche Voraussetzung für die erfolgreiche Kalibrationsentwicklung in der Nahinfrarotspektroskopie. Die Ursache für die hohe Variation von CLA c9 t11 ist dessen hauptsächliche Akkumulation in Triglyceriden und die damit verbundene Variation in Abhängigkeit vom intramuskulären Fettgehalt [DANNENBERGER et al. 2004, SCOLLAN et al. 2006].

Ein ähnliches Ergebnis ist auch in der Untersuchung von SIERRA et al. [2008] zur Vorhersage der Fettsäuregehalte in Rindfleisch mit NIT (NIRS-Messung in Transmission) zu finden: Unter den Parametern mit mehr als einer Doppelbindung wies CLA c9 t11 die beste Kalibrationsstatistik auf. Mit einem Bestimmtheitsmaß der Kreuzvalidierung (1-VR) von 0,58 und einem RPD von 1,52 zeigte diese Kalibrierung jedoch kein wünschenswertes Resultat. Generell war es SIERRA et al. [2008] nicht möglich, für mehrfach ungesättigte Fettsäuren bzw. deren Summe annehmbare Kalibrierungen zu entwickeln. Dieser Sachverhalt ergab sich auch in der vorliegenden Arbeit.

Die Studie von SIERRA et al. [2008] ist bisher die einzige, in der **absolute** Referenzdaten für die Entwicklung von NIRS-Kalibrierungen für Fettsäureparameter in **Rindfleisch** eingesetzt wurden. SIERRA et al. [2008] gelang die Vorhersage der Summenparameter SFA und MUFA in Rindfleisch (*M. longissimus thoracis*) mit guter Genauigkeit (1-VR = 0,84 und 0,85; RPD = 2,46 und 2,57). In der vorliegenden Studie konnten diese Fettsäuregruppen mit hervorragenden Resultaten kalibriert werden (1-VRs > 0,99, RPDs > 8). Auch die Erfassung von Einzelfettsäuren ist mit den in der vorliegenden Arbeit entwickelten Kalibrierungen erfolgreicher möglich. So ließen sich beispielsweise die Hauptfettsäuren Palmitinsäure (C16:0), Stearinsäure (C18:0) und Ölsäure (C18:1) mit Bestimmtheitsmaßen der Kreuzvalidierung (1-VR) von > 0,97 kalibrieren, bei RPDs > 3,8. SIERRA et al. [2008] erreichten für diese Fettsäuren in der Kreuzvalidierung Bestimmtheitsmaße < 0,87 und RPDs < 2,7. Die Ursache für die höhere Genauigkeit der Kalibrierungen in der vorliegenden Arbeit ist vermutlich in der eingesetzten Technik zu finden. SIERRA et al. [2008] verwendeten ein NIR-Spektrometer, welches die Proben in Transmission über einen Wellenlängenbereich von 800 - 1050 nm scannt. Das in dieser Untersuchung eingesetzte Gerät misst in Reflexion und erfasst die Spektren von 400 - 2500 nm. Die Informationen aus dem Spektralbereich > 1050 nm tragen wesentlich zur Verbesserung der Güte der Kalibrierung bei, da in diesem Bereich die Molekülgruppen, die in Fettsäuren vorkommen (CC, CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>, CO, COOR) Strahlung absorbieren [MURRAY 2003, WINDHAM AND MORRISON 1998]. Diese Informationen fehlen in den Kalibrierungen von SIERRA et al. [2008]. Dennoch wird auch in ihrer Studie deutlich, dass

---

<sup>7</sup> Variationskoeffizient; Quotient aus Standardabweichung und Mittelwert des Cal-Sets

bei absoluten Referenzwerten hauptsächlich gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren sowie deren Summenparameter mit gutem Ergebnis kalibriert werden können.

Unter den Kalibrierungen für **relative** Parameter in **Schweinefleisch** erreichte keine ein  $RPD \geq 2$ . Der Anforderung  $RSQ_{cal} \geq 0,83$  wurden lediglich die Kalibrierungen für die mehrfach ungesättigten Parameter Arachidonsäure (C20:4 c5,8,11,14) und die Summe der omega-6-Fettsäuren ( $\Sigma n-6$ ) gerecht. Wie bei den Kalibrierungen für relative Parameter in Rindfleisch, war auch hier das Phänomen der besseren Resultate bei mehrfach ungesättigten Parametern zu erkennen.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der Untersuchung von GONZALES-MARTIN et al. [2005], in der ebenfalls keine  $RPD$ -Werte  $\geq 2$  erreicht wurden<sup>8</sup>. Die Kalibrierungen bei GONZALES-MARTIN et al. [2005] wiesen jedoch z.T. erheblich höhere Bestimmtheitsmaße auf. So wurden für die Summenparameter SFA und MUFA Kalibrierungen mit  $RSQ_{cal}$  von 0,81 und 0,94 beschrieben. In der vorliegenden Arbeit ergaben sich für SFA und MUFA Kalibrierungen mit  $RSQ_{cal}$  von 0,63 und 0,69, obwohl eine ähnliche (SFA) bzw. größere Streuung (MUFA) im Datenmaterial vorhanden war. Die Kalibrierung für PUFA lag mit einem  $RSQ_{cal}$  von 0,82 in einem vergleichbaren Bereich wie bei GONZALES-MARTIN et al. [2005] (0,86).

Bei der Validierung mit einem unabhängigen Datensatz verzichteten GONZALES-MARTIN et al. [2005] auf die übliche Angabe der Validationsstatistik und wiesen als Kriterium zur Abschätzung der Leistungsfähigkeit der Kalibrierungen nicht den SEP, sondern die prozentuale Abweichung zwischen NIRS- und Referenzwert aus. Diese lag für SFA, MUFA und PUFA bei 3,85 %, 2,37 % und 13,67 %. Werden anhand des SEPs und des Mittelwertes des Val-Sets die prozentualen Differenzen für die Kalibrierungen in der vorliegenden Arbeit berechnet, ergeben sich mit 4,83 % (SFA), 5,10 % (MUFA) und 14,71 % (PUFA) etwas höhere Werte. Die Genauigkeiten der Kalibrierungen für Einzelfettsäuren waren vergleichbar. Die Tendenz zu besseren Kalibrationsstatistiken für mehrfach ungesättigte Parameter war auch bei GONZALES-MARTIN et al. [2005] zu erkennen.

In der Literatur ist es üblich, den Anteil einer Fettsäure an den Gesamtfettsäuren anzugeben und nicht die tatsächlichen, absoluten Gehalte. Den wenigen existierenden Untersuchungen zur Eignung von NIRS für die Vorhersage von Fettsäuren in Fleisch liegen somit hauptsächlich Daten über die relative Fettsäurezusammensetzung zu Grunde. Soweit der Autorin bekannt ist, ist die vorliegende Arbeit die erste, in der absolute

<sup>8</sup> Bei GONZALES-MARTIN et al. [2005] gibt es keine Angaben zu  $RPDs$  und  $SEPs$ . Um die Güte der Kalibrierungen beurteilen zu können, wurde der  $RPD$  als  $SD/SECV$  berechnet.

Referenzdaten für Kalibrierungen von Fettsäureparametern in Schweinefleisch verwendet wurden.

Wie bei den Kalibrierungen für **absolute** Fettsäureparameter in Rindfleisch konnten auch in **Schweinefleisch** ausschließlich Fettsäuren ohne bzw. mit maximal einer Doppelbindung erfolgreich kalibriert werden. Selbst für Linolsäure, die mit 133 mg/100 g Muskel in einem ähnlichen Umfang in den Schweinefleischproben enthalten war, wie die mit sehr gutem Ergebnis kalibrierte Stearinsäure (136 mg/100 g), ergab sich keine Kalibrierung, die den Auswahlkriterien entsprach. Als Ursache für das mangelhafte Kalibrationsergebnis ist der Variationsbereich anzuführen: Der mittlere Linolsäuregehalt lag zwar in der gleichen Größenordnung wie Stearinsäure, die Streuung war jedoch wesentlich kleiner (Linolsäure:  $133 \pm 18$  mg/100 g vs. Stearinsäure:  $136 \pm 53$  mg/100 g).

Sowohl in Rind- als auch in Schweinefleisch wurden Unterschiede in der Kalibrationsgüte in Anhängigkeit von der Dimension der Referenzwerte deutlich. Bei relativen (%) Daten ergaben sich einsetzbare Kalibrierungen hauptsächlich für Parameter mit mehr als einer Doppelbindung. Lagen absolute (mg FS/100 g Muskel) Referenzwerte zu Grunde, konnten ausschließlich gesättigte und einfach ungesättigte Komponenten erfolgreich kalibriert werden. Eine Erklärung für dieses Phänomen wird ersichtlich, wenn man sich das Funktionsprinzip der Nahinfrarotspektroskopie vor Augen führt. Die Nahinfrarotspektroskopie ist ein quantitatives Verfahren, bei dem die Absorption an bestimmten Wellenlängen mit der Menge eines infrarotaktiven Inhaltsstoffes ansteigt. Relative Fettsäureparameter sagen jedoch nichts über die absolute Menge einer Komponente im Muskel aus, sondern geben lediglich den Anteil in einem Kompartiment, dem intramuskulären Fett, an. Theoretisch dürfte daher die Kalibrationsentwicklung für Parameter mit dieser Dimension wenig erfolgreich verlaufen. Betrachtet man die Kalibrierungen für relative Fettsäureparameter, wird dieser Sachverhalt auch anhand der ungünstigen Kalibrationsstatistiken für gesättigte und einfach ungesättigte Parameter deutlich. Ausnahmen bilden jedoch Inhaltsstoffe mit mehr als einer Doppelbindung. Die z.T. recht guten Ergebnisse für mehrfach ungesättigte Fettsäureparameter sind nur durch die hohe Korrelation dieser Parameter mit dem IMF (s. Anhang) zu erklären. Kann ein Parameter mit NIRS vorhergesagt werden, sind erfolgreiche Kalibrationen auch für diejenigen Inhaltsstoffe zu erwarten, die mit diesem Parameter hoch korreliert sind [TILLMANN 2006]. Der Fettgehalt von Fleisch ist sehr gut mit NIRS bestimmbar [PREVOLNIK et al. 2004] und demzufolge auch indirekt mit dem IMF hoch korrelierte Inhaltsstoffe.

Wenn somit absolute Daten die Grundlage für eine erfolgreiche Entwicklung von NIRS-

Kalibrierungen sind, weshalb ergeben sich dann für mehrfach ungesättigte Fettsäuren und Summenparameter nicht ähnlich gute Kalibrierungen, wie für gesättigte und einfach ungesättigte Parameter in dieser Dimension? Die Ursache hierfür ist die mangelnde Variation der mehrfach ungesättigten Parameter in dem untersuchten Datenmaterial. Verglichen mit gesättigten und einfach ungesättigten Verbindungen schwankten die Daten für mehrfach ungesättigte Komponenten in einem wesentlich engeren Bereich. Werden beispielsweise die in Schweinefleisch in ähnlichen Mengen enthaltenen Fettsäuren Linolsäure und Stearinsäure verglichen, wird ersichtlich, dass für die stärker variierende Stearinsäure ( $136 \pm 53$  mg/100 g) ein wesentlich besseres Kalibrationsergebnis erzielt werden konnte als für die in ihrer Menge nur wenig schwankende Linolsäure ( $133 \pm 18$  mg/100 g).

Der Grund für die geringe Variation der Gehalte mehrfach ungesättigter Fettsäuren liegt in deren Funktion. Mehrfach ungesättigte Fettsäuren sind als Phospholipide wichtige Bausteine von Zellmembranen (Strukturlipide), während gesättigte und einfach ungesättigte Fettsäuren hauptsächlich in Form von Triglyceriden als Energiereserve gespeichert werden (Speicherlipide) [GURR 1999]. Steigt der Verfettungsgrad eines Tieres, erhöht sich in erster Linie die Fraktion der Triglyceride. Der Anteil der Phospholipide und damit der Umfang mehrfach ungesättigter Fettsäuren bleibt jedoch weitestgehend konstant [SCOLLAN et al. 2006, WOOD et al. 2008].

Bei Monogastriern wie Schweinen kann über die Fütterung auch die Menge der mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Muskel relativ problemlos erhöht werden [GURR 1999, WOOD et al. 2008]. Anders als beim Rind, wo die Einlagerung mehrfach ungesättigter Fettsäuren fast ausschließlich in die Phospholipide erfolgt, werden beim Schwein PUFA auch in Triglyceriden gespeichert [WOOD et al. 2008]. Hinzu kommt, dass beim Schwein die Futterfettsäuren den Verdauungstrakt ohne Veränderungen passieren, während beim Rind die Pansenmikroorganismen die über das Futter aufgenommenen ungesättigten Fettsäuren größtenteils saturieren (Biohydrogenierung) [WOOD AND ENSER 1997, WOOD et al. 2008]. Es besteht jedoch auch beim Rind die Möglichkeit, Fettsäuren in Fleisch und Fett über die Fütterung zu modifizieren [SCOLLAN et al. 2006]. Eine Erweiterung der Datensätze für die NIRS-Kalibrationsentwicklung um Fleischproben, deren Gehalte an mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch die Fütterung verändert wurden, stellt eine Option dar, die Variation im Datensatz zu erhöhen. Auch hätte der Einsatz weiterer Rassen Potential, die Streuung mehrfach ungesättigter Parameter zu steigern [WOOD et al. 2008]. Derartige Fleischproben standen für die vorliegende Arbeit aber nicht zur Verfügung. In Folgeuntersuchungen wären sie jedoch eine wichtige Voraussetzung, um auch für mehrfach ungesättigte Fettsäureparameter einsatzfähige Kalibrierungen entwickeln zu können.

Eine andere Erklärung für die ungünstigen Kalibrationsstatistiken der mehrfach ungesättigte Parameter in absoluter Dimension könnte auch die fehlende Korrelation mit dem intramuskulären Fett sein. Diese These setzt allerdings voraus, dass auch die Kalibrierungen für absolute Parameter nicht auf Wechselwirkungen der einzelnen Fettsäuren mit der nahinfraroten Strahlung basieren. Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass alle Fettsäuremoleküle die gleichen absorbierenden Gruppen aufweisen (CH, CH<sub>2</sub>, CH<sub>3</sub>). Die geringen Unterschiede im Aufbau der Fettsäuren führen zu ähnlichen NIR-Absorptionsmustern, was die Bestimmung einer einzelnen Komponente problematisch gestalten könnte [WINDHAM AND MORRISON 1998].

Unterschiede in der Güte der entwickelten Kalibrierungen waren auch in Abhängigkeit vom Probenmaterial zu erkennen. Sowohl bei relativen als auch bei absoluten Parametern ergaben sich bessere Kalibrationsstatistiken in Rindfleisch. Die Kalibrierung für den absoluten Summenparameter MUFA beispielsweise zeigte sowohl in Rind- als auch in Schweinefleisch eine der besten Kalibrationsstatistiken. In Schweinefleisch erreichte dieser Parameter mit einem RSQ<sub>cal</sub> von 0,98 und einem RPD von 4,41 ein sehr gutes Ergebnis. In Rindfleisch konnte jedoch mit einem RSQ<sub>cal</sub> von 0,99 und einem RPD von 10,31 eine noch bessere Kalibrierung erzielt werden. Im Vergleich zu den Schweinedaten waren die Parameter in den Datensätzen von Rindfleisch durch deutlich größere Streubereiche gekennzeichnet, einer wichtigen Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung von Kalibrierungen.

Bei den relativen Daten ist jedoch nicht ausschließlich der Variationsbereich des jeweiligen Parameters für die Güte der Kalibrierung ausschlaggebend. Da die Kalibrierungen relativer Daten auf die Korrelation mit dem IMF zurück zu führen sind, ist die Streuung dieses Fleischinhaltsstoffes ein bedeutender Faktor in der Kalibrationsentwicklung. Unter diesem Aspekt sind auch die etwas besseren Kalibrierungen bei GONZALES-MARTIN et al. [2005] für relative Fettsäureparameter in Schweinefleisch zu betrachten: GONZALES-MARTIN et al. [2005] setzten in ihrer Studie Fleisch von iberischen Schweinen ein, das mit durchschnittlich 8 - 11 % [GONZALES-MARTIN et al. 2002] den Fettgehalt des in dieser Arbeit verwendeten Fleisches von 1,35 % deutlich übersteigt. Hinsichtlich der Fettsäurezusammensetzung zeigen sich der für fetttere Tiere typische Rückgang des Anteils an Linolsäure und damit verbunden auch die Verminderung von PUFA zugunsten von Ölsäure und MUFA [WOOD et al. 2008]. Diese Verschiebung führte jedoch nicht zu einer größeren Streuung der Parameter, was eine Erklärung für die z.T. besseren Kalibrierungen gewesen wäre. Da die Proben bei GONZALES-MARTIN et al. [2005] von iberischen Schweinen stammten, die zudem unterschiedlich gefütterten wurden, ist anzunehmen, dass in ihrer Untersuchung eine

größere Variation des IMFs vorlag, die indirekt zu den teilweise etwas besseren Kalibrationsergebnissen führte.

In der vorliegenden Arbeit konnten NIRS-Kalibrierungen für die Vorhersage von Fettsäureparametern in Rind- und Schweinefleisch erfolgreich entwickelt werden. Es wurde gezeigt, dass die Bestimmung sowohl relativer als auch absoluter Fettsäuredaten mit NIRS möglich ist, wobei bessere Resultate für absolute Daten mit entsprechendem Variationsbereich erzielt wurden. Ein Teil der Kalibrierungen genügte nicht den strengen Anforderungen, die einen routinemäßigen Einsatz anstelle des Referenzverfahrens rechtfertigen würden. In diesen Fällen eignete sich NIRS jedoch als Screeningverfahren zur Identifizierung interessanter Proben.

Der Einsatz des NIRS-Verfahrens in *QuaLIPID* ermöglichte die zeitsparende und kostengünstige Erfassung von Fettsäureparametern in einer Vielzahl von Proben und schuf somit die Voraussetzung für das erfolgreiche Fortschreiten des Verbundprojektes.

### **3 TEIL II: ANWENDUNG DES NIRS-VERFAHRENS – SCHÄTZUNG VON GENETISCHEN PARAMETERN UND ZUCHTWERTEN ANHAND VON NIRS-DATEN FÜR DIE IDENTIFIZIERUNG VON INDIVIDUEN MIT EXTREMER GENETISCHER VERANLAGUNG**

#### **3.1 HINTERGUND**

Eine der Aufgaben im Rahmen des QuaLIPID-Projektes war die Durchführung von Assoziationsstudien zur Verifizierung von identifizierten DNA-Varianten als potentielle Marker für fettqualitätsrelevante Merkmale. Diese Untersuchungen sollten an Tieren erfolgen, die sich in ihrer genetischen Veranlagung für fettqualitätsrelevante Merkmale deutlich von einander unterschieden. Die Auswahl derartig extremer Individuen war anhand von Zuchtwerten geplant. Die Zuchtwertschätzung ist ein schlagkräftiges Selektionsinstrument in der Tierzucht, das es ermöglicht, die Auswirkung der tierindividuellen genetischen Ausstattung auf die Ausprägung eines Merkmals abzuschätzen und den durch den Einsatz eines Tieres zu erwartenden Zuchtfortschritt in einer Population vorherzusagen [DEMPFLE 1994, SCHÜLER et al. 2001]. Mit Hilfe statistischer Verfahren wird anhand der Phänotypen von Individuen sowie deren Verwandter (z.B. Eltern, Geschwister, Nachkommen) der Einfluss der Genetik auf die Merkmalsausprägung geschätzt und von Umwelteinflüssen abgegrenzt. In den merkmalsbezogenen Zuchtwerten finden somit alle Faktoren Berücksichtigung, die die Ausprägung eines Merkmals beeinflussen. Dazu zählen Umwelteinflüsse, wie z.B. Fütterung und Haltung, aber auch tierindividuelle Faktoren, wie Rasse und Abstammung.

Der Zuchtwertschätzung geht die Schätzung von Varianzkomponenten voraus. Die Varianzkomponentenschätzung ist ein essentielles Verfahren in der heutigen Tierzuchtwissenschaft, das die Abschätzung des genetischen und nicht-genetischen Anteils an einer Merkmalsausprägung ermöglicht. Die resultierenden genetischen und phänotypischen Varianzen und Kovarianzen sind Voraussetzung für die Schätzung von

Zuchtwerten.

Bei der Varianzkomponentenschätzung wird die phänotypische Varianz (Varianz der Merkmalsausprägung) in ihre Bestandteile zerlegt. Mit einem linearen Modell, das fixe Umwelteffekte und zufällige additiv-genetische Effekte (Tiereffekt, Vatoreffekt) berücksichtigt, erfolgt die Zerlegung der phänotypischen Varianz in die Umweltvarianz, die genetische Varianz und eine nicht erklärte Restvarianz.

Über die geschätzten Varianzen können die genetischen Parameter Heritabilität („Erblichkeit“), phänotypische und genetische Korrelation<sup>9</sup> bestimmt werden. Die Kenntnis über die Heritabilität eines Merkmals und dessen genetische und phänotypische Korrelation mit anderen Merkmalen ermöglicht die Beurteilung der Modellierbarkeit eines Merkmals durch züchterische Maßnahmen [SCHÜLER et al. 2001].

Die Berechnung der Heritabilität ( $h^2$ ) erfolgt nach folgender Formel:

$$h^2 = \frac{\sigma_A^2}{\sigma_P^2},$$

wobei  $\sigma_A^2$  die additiv-genetische Varianz und  $\sigma_P^2$  die phänotypische Varianz darstellt. Die genetische Korrelation ( $r_G$ ) zwischen Merkmal X und Merkmal Y ist das Verhältnis der genetischen Kovarianz  $\text{cov}_{GXY}$  zwischen Merkmal X und Y zu dem Produkt der beiden genetischen Standardabweichungen  $\sigma_{GX}$  und  $\sigma_{GY}$ :

$$r_G = \frac{\text{cov}_{GXY}}{\sigma_{GX} \cdot \sigma_{GY}}$$

Analog wird die phänotypische Korrelation zwischen zwei Merkmalen berechnet [FALCONER 1984].

Der (wahre) Zuchtwert eines Tieres gibt die Differenz seiner Nachkommen in einem Merkmal zum Durchschnitt einer Referenzpopulation an. Mathematisch kann dieser Sachverhalt wie folgt dargestellt werden:

$$ZW = 2 \cdot (NK - P),$$

wobei ZW der wahre Zuchtwert eines Tieres ist, NK die mittlere Leistung der Nachkommen dieses Tieres für ein Merkmal X und P die mittlere Leistung in der Population. Da für die Berechnung des wahren Zuchtwertes eines Tieres Bedingungen erfüllt sein müssen, die unter normalen Umständen nicht gegeben sind (unendliche Anzahl von Nachkommen; Paarungspartner entstammen derselben Population; gleiche

<sup>9</sup> genetische Korrelation: Beziehung zwischen Merkmalen auf genetischer Ebene;  
phänotypische Korrelation: berücksichtigt Einflüsse von Genetik und Umwelt



Umwelteffekte für Nachkommen und Referenzpopulation), wird der Zuchtwert eines Tieres geschätzt. Dabei werden neben eventuell vorhandenen Nachkommenleistungen auch Informationen anderer Verwandter (Ahnen, Geschwister) berücksichtigt. Durch die Beachtung von Umwelteffekten (z.B. Fütterung, Betrieb, Saison) und bei einer ausreichend großen Datengrundlage nähert sich der geschätzte Zuchtwert dem wahren Zuchtwert weitestgehend an [FÜRST et al. 2009].

## 3.2 MATERIAL UND METHODEN

Mit Hilfe der im Teil I beschriebenen NIRS-Kalibrierungen wurden die an der LfL in den vergangenen Jahren aufgenommenen NIR-Spektren rückwirkend hinsichtlich der Fettsäureparameter ausgewertet. Für die Spezies Rind konnte so ein Datensatz mit Merkmalen von 2.110 Fleckvieh-Bullen generiert werden. Die Tiere waren im Zeitraum von März 2003 bis März 2007 im Rahmen der Nachkommenprüfung auf Fleischleistung [BStMLF 2003] auf den Prüfstationen der LfL eingestallt gewesen.

Beim Schwein wurden Spektren von 11.070 Tieren ausgewertet. Vertreten waren die Rassen Deutsches Edelschwein, Deutsche Landrasse und Pietrain sowie Kreuzungen dieser Rassen. Die Spektren stammten von Tieren, die zwischen Januar 2004 und September 2007 die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit [ZDS 2007] an der LfL absolviert hatten.

Anhand der absoluten Daten für die entsprechenden Einzelfettsäuren wurden die Desaturase-Indices 16:1/16:0 und 18:1/18:0 berechnet. Diese Werte sind ein Anhaltspunkt für die Aktivität von  $\Delta 9$ -Desaturasen, die die Synthese einer *cis*-Doppelbindung zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoffatom (vom Carboxylende gezählt) in Fettsäuren katalysieren.

Aus den relativen Werten für die Summe der omega-3- ( $\Sigma n-3$ ) und omega-6-Fettsäuren ( $\Sigma n-6$ ) wurde der Quotient  $n-6/n-3$  gebildet. Diese Kennzahl gibt das Verhältnis der für den Menschen essentiellen Fettsäurefamilien an. Erstrebenswert sind in der menschlichen Ernährung Quotienten  $< 5$  [DGE et al. 2000].

Die statistische Analyse des Datenmaterials und die Schätzung von Zuchtwerten für ausgewählte Merkmale wurde am Institut für Tierzucht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft durch Herrn U. Geuder (Rind) und Herrn Dr. J. Dodenhoff (Schwein) durchgeführt.

### 3.2.1 VARIANZKOMPONENTENSCHÄTZUNG

Die Analyse des Datenmaterials auf systematische Einflüsse (fixe Effekte) erfolgte mit dem Programmpaket DMU [MADSEN AND JENSEN 2000]. Für die Spezies Rind wurde

folgendes Modell angenommen:

$$y_{ijk} = \text{SMONTH}_i + \text{Anim}_j + \text{Gewk}_k + e_{ijk}$$

mit

$y$  - Ausprägung des Merkmals

$\text{SMONTH}_i$  - fixer Effekt der i-ten Klasse (Station x Schlachtmonat)

$\text{Anim}_j$  - zufälliger additiv genetischer Effekt des j-ten Tieres

$\text{Gewk}_k$  - Effekt des auf den 450. Lebenstag korrigierten k-ten  
Endgewichts (Covariable)

$e_{ijk}$  - zufälliger Restfehler

Beim Schwein wurde die Analyse getrennt nach Mutter- und Vatterassen durchgeführt. Unter „Muterrassen“ (MR) sind dabei die Rassen Deutsche Landrasse (DL) und Deutsches Edelschwein (DE) sowie die Kreuzungen DE x DL und DL x DE zu verstehen. Da sich keine nennenswerten rassenspezifischen Unterschiede im Datenmaterial der Muterrassen zeigten, wurden die Datensätze der Muterrassen zusammengefasst, um die Präzision der Schätzung zu verbessern ( $n = 8.135$ ). Die Rasse wurde als fixer Effekt im Modell berücksichtigt. Als „Vatterasse“ war ausschließlich die Rasse Pietrain vertreten ( $n = 2.935$ ). Die Analyse erfolgte mit folgendem statistischen Modell:

$$y_{ijklm} = \text{SWEEK}_i + \text{PA}_j + \text{Gruppe}_k + \text{Anim}_l + \text{Gewicht}_m + e_{ijklm}$$

mit

$y$  - Ausprägung des Merkmals

$\text{SWEEK}_i$  - fixer Effekt der i-ten Klasse

MR: (Station x Schlachtwoche)

VR: (Station x 2 Schlachtwochen)

$\text{PA}_j$  - fixer Effekt der j-ten Rasse (nur im Modell für MR)

$\text{Gruppe}_k$  - zufälliger Effekt der k-ten Prüfgruppe

$\text{Anim}_l$  - zufälliger additiv genetischer Effekt des l-ten Tieres

$\text{Gewicht}_m$  - Effekt des m-ten Schlachtgewichtes (Covariable)

$e_{ijklm}$  - zufälliger Restfehler

### 3.2.2 ZUCHTWERTSCHÄTZUNG

Der Zuchtwertschätzung liegen die in Abschnitt 3.2.1 beschriebenen Modelle unter Berücksichtigung der Abstammung der einzelnen Tiere (Pedigree) zu Grunde. Als Schätzverfahren kam das BLUP-Tiermodell (*best linear unbiased prediction* [HENDERSON 1973]) zum Einsatz. Die Schätzungen erfolgten bei dem weniger umfangreichen Datensatz vom Rind mit dem Softwarepaket PEST [GROENEVELD et al. 1990]. Bei den Daten der Spezies Schwein wurde das Programm MiX99 [VUORI et al. 2006] eingesetzt.

### 3.2.3 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Untersuchungen zur Assoziation von DNA-Varianten und Fettqualitätsparametern sollten an Individuen erfolgen, die sich durch ihre genetische Veranlagung zur Ausprägung von fettstoffwechselrelevanten Merkmalen im extrem niedrigen bzw. hohen Bereich auszeichneten. Mit Hilfe von Zuchtwerten wurden diese Tiere identifiziert und in zwei Gruppen eingeteilt, in denen dann ausgewählte DNA-Varianten typisiert und die Verteilung der Genotypen gegenübergestellt werden sollten (vgl. Teil III).

Um zu prüfen, ob sich die beiden Gruppen in fettstoffwechselrelevanten Merkmalen statistisch signifikant unterschieden, wurden die Merkmalsmittelwerte mit Hilfe eines t-Tests für unverbundene Stichproben verglichen. Dafür wurde die Prozedur TTEST des Programmpaketes SAS [SAS 2002] eingesetzt.

### 3.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

#### 3.3.1 HERITABILITÄTEN UND KORRELATIONEN IN DER SPEZIES RIND

In der Spezies Rind ergaben sich moderate bis hohe Erblichkeiten<sup>10</sup> der fettqualitätsrelevanten Merkmale (Tab. 3-1 und 3-2). Die Heritabilität des intramuskulären Fettgehaltes wurde für die in dieser Arbeit untersuchte Zweinutzungsrasse Fleckvieh mit 0,39 geschätzt. Dieser Wert liegt unter der bei AASS [1996] für die Zweinutzungsrasse Norwegisches Rotvieh angegebenen Erblichkeit von 51%, bewegt sich aber in dem bei MARSHALL [1999] für die Heritabilität des IMF ausgewiesenen Bereich (0,26 - 0,93).

In der Literatur gibt es nur wenige Studien, in denen genetische Parameter für Fettsäuremerkmale geschätzt wurden [DE SMET et al. 2004]. Soweit der Autorin bekannt ist, ist die vorliegende Arbeit die erste, die genetische Parameter für absolute Fettsäuredaten ausweist.

Die Heritabilitäten für Einzelfettsäuren und Summenparameter erstrecken sich von 0,32 bis 0,50 und übersteigen damit die bei PITCHFORD et al. [2002] und KNIGHT et al. [2004] angegebenen Erblichkeiten von < 27 % und 14 - 33 %. Als Ursache für diese Unterschiede ist das in der vorliegenden Arbeit eingesetzte Datenmaterial anzunehmen, das ausschließlich an Tieren der Rasse Fleckvieh und unter äußerst standardisierten Umweltbedingungen erhoben wurde.

KNIGHT et al. [2004] ermittelten moderate Heritabilitäten für die Desaturase-Indices 16:1/16:0 und 18:1/18:0. Ihr Ergebnis konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden.

Sowohl für die relativen als auch für die absoluten Fettsäureparameter ergaben sich z.T. sehr hohe Korrelationen mit dem IMF (Tab. 3-1 und 3-2). Erwartungsgemäß fielen bei relativen Merkmalen die Zusammenhänge zwischen den hauptsächlich in Phospholipiden lokalisierten mehrfach ungesättigten Verbindungen und IMF negativ aus. Einfach ungesättigte und gesättigte Parameter zeigten positive, jedoch weniger enge Korrelationen mit dem IMF (< 0,72). Die Ursache hierfür ist die weitestgehend konstante Menge an Phospholipiden und damit an ungesättigten Fettsäuren im Muskel. Steigt der Verfettungsgrad eines Tieres mit dem Alter oder durch die Fütterung, erhöht sich im

---

<sup>10</sup> niedrige Heritabilität: < 0,2; moderat: 0,2 - 0,5; hoch: 0,5 - 0,8; sehr hoch: > 0,8

Muskel hauptsächlich die Triglyceridfraktion und damit die Menge der gesättigten und einfach ungesättigten Verbindungen. Die konstante Menge der PUFAs wird durch die Zunahme von SFA und MUFA „verdünnt“ und hat nunmehr einen geringeren Anteil an den Gesamtfettsäuren im Muskel [DE SMET et al. 2004, WOOD et al. 2008].

Lagen absolute Daten zu Grunde, konnten auch für mehrfach ungesättigte Verbindungen positive Korrelationen mit dem IMF verzeichnet werden. Diese fielen aus oben genanntem Grund jedoch etwas geringer aus als die Korrelationen zwischen einfach ungesättigten bzw. gesättigten Parametern und dem IMF.

Die moderaten bis hohen Erblichkeiten der fettstoffwechselbezogenen Merkmale lassen den Schluss zu, dass Unterschiede zwischen den Tieren zu einem großen Teil genetisch bedingt sind. Eine die Fleischqualität verbessernde Modulation dieser Parameter durch züchterische Maßnahmen ist somit möglich.

**Tab. 3-1:** Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen relativer Fettsäureparameter in Rindfleisch

	IMF	18:1c9	18:2	18:3n-3	20:3n-6	20:4	22:4	22:5n-3	SFA	MUFA	PUFA	n-3	n-6	n-6/n-3
IMF	<b>0.388</b>	0.629	-0.995	-0.971	-0.988	-0.994	-0.996	-0.983	0.481	0.722	-0.994	-0.993	-0.976	0.257
18:1c9	0.532	<b>0.478</b>	-0.674	-0.681	-0.559	-0.689	-0.608	-0.686	-0.347	0.984	-0.716	-0.675	-0.678	0.073
18:2	-0.806	-0.639	<b>0.486</b>	0.995	0.916	0.997	0.995	0.980	-0.430	-0.736	0.994	0.995	0.993	-0.129
18:3n-3	-0.767	-0.688	0.919	<b>0.442</b>	0.913	0.999	0.998	0.980	-0.387	-0.743	0.999	0.983	0.996	-0.125
20:3n-6	-0.800	-0.585	0.878	0.826	<b>0.346</b>	0.915	0.944	0.944	-0.461	-0.619	0.906	0.962	0.879	-0.429
20:4	-0.838	-0.663	0.966	0.881	0.920	<b>0.495</b>	0.985	0.982	-0.400	-0.759	0.991	0.995	0.988	-0.164
22:4	-0.851	-0.588	0.888	0.830	0.938	0.943	<b>0.398</b>	0.953	-0.475	-0.703	0.974	0.997	0.960	-0.306
22:5n-3	-0.888	-0.678	0.916	0.867	0.918	0.952	0.943	<b>0.443</b>	-0.416	-0.753	0.983	0.992	0.953	-0.294
SFA	0.306	-0.358	-0.410	-0.247	-0.393	-0.392	-0.422	-0.364	<b>0.493</b>	-0.274	-0.367	-0.431	-0.416	0.134
MUFA	0.573	0.973	-0.707	-0.765	-0.637	-0.723	-0.650	-0.717	-0.278	<b>0.466</b>	-0.779	-0.733	-0.743	0.085
PUFA	-0.826	-0.679	0.975	0.890	0.903	0.993	0.920	0.942	-0.366	-0.737	<b>0.491</b>	0.991	0.997	-0.118
n-3	-0.855	-0.689	0.976	0.931	0.906	0.960	0.896	0.938	-0.350	-0.747	0.960	<b>0.475</b>	0.977	-0.234
n-6	-0.801	-0.672	0.955	0.904	0.894	0.967	0.910	0.913	-0.345	-0.730	0.971	0.941	<b>0.487</b>	-0.045
n-6/n-3	0.303	0.141	-0.190	-0.209	-0.172	-0.124	-0.096	-0.199	0.051	0.144	-0.113	-0.291	0.012	<b>0.183</b>

**Tab. 3-2:** Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen absoluter Fettsäureparameter in Rindfleisch

	IMF	14:0	14:1	16:0	16:1	18:0	Σ 18:1t	18:1c9	18:1c11	CLA	SFA	MUFA	18:3n-3	22:4	14:1/ 14:0	16:1/ 16:0	18:1/ 18:0
IMF	<b>0,386</b>	0,998	0,993	1,000	1,000	0,997	0,995	0,984	0,927	0,997	1,000	0,985	0,800	0,894	1,000	0,636	0,689
14:0	0,970	<b>0,422</b>	0,996	0,985	0,995	0,970	0,953	0,963	0,920	0,931	0,990	0,967	0,802	0,926	1,000	0,697	0,692
14:1	0,962	0,977	<b>0,410</b>	0,990	0,993	0,959	0,974	0,976	0,929	0,953	0,987	0,979	0,774	0,871	1,000	0,632	0,718
16:0	0,974	0,985	0,973	<b>0,453</b>	0,991	0,977	0,955	0,984	0,937	0,957	0,995	0,986	0,752	0,913	1,000	0,562	0,706
16:1	0,975	0,991	0,986	0,988	<b>0,410</b>	0,971	0,972	0,975	0,931	0,953	0,993	0,979	0,797	0,929	1,000	0,685	0,711
18:0	0,957	0,967	0,953	0,971	0,965	<b>0,439</b>	0,939	0,941	0,856	0,955	0,991	0,943	0,795	0,862	1,000	0,626	0,557
Σ 18:1t	0,951	0,965	0,948	0,976	0,969	0,956	<b>0,482</b>	0,958	0,919	0,991	0,957	0,963	0,825	0,864	1,000	0,614	0,691
18:1c9	0,966	0,977	0,972	0,985	0,984	0,943	0,965	<b>0,429</b>	0,980	0,940	0,971	-	0,739	0,900	-	0,556	0,808
18:1c11	0,910	0,929	0,924	0,930	0,935	0,860	0,918	0,973	<b>0,421</b>	0,896	0,905	0,979	0,676	0,835	1,000	0,490	0,899
CLA	0,956	0,959	0,956	0,969	0,973	0,953	0,975	0,962	0,907	<b>0,399</b>	0,951	0,946	0,845	0,847	0,992	0,649	0,671
SFA	0,972	0,987	0,974	0,991	0,987	0,988	0,976	0,972	0,907	0,971	<b>0,440</b>	0,973	0,790	0,912	1,000	0,626	0,651
MUFA	0,966	0,979	0,973	0,986	0,985	0,943	0,968	-	0,973	0,964	0,974	<b>0,427</b>	0,745	0,903	1,000	0,567	0,804
18:3n-3	0,732	0,739	0,725	0,731	0,742	0,765	0,773	0,717	0,636	0,770	0,757	0,720	<b>0,321</b>	0,678	0,945	0,972	0,462
22:4	0,941	0,967	0,942	0,960	0,962	0,937	0,936	0,955	0,908	0,933	0,960	0,956	0,700	<b>0,467</b>	1,000	0,630	0,691
14:1/14:0	0,522	0,507	0,619	0,543	0,546	0,529	0,528	-	0,499	0,540	0,545	0,538	0,384	0,498	<b>0,280</b>	0,391	0,780
16:1/16:0	0,474	0,521	0,523	0,437	0,539	0,457	0,458	0,467	0,448	0,506	0,476	0,470	0,414	0,487	0,416	<b>0,256</b>	0,307
18:1/18:0	0,587	0,606	0,599	0,627	0,616	0,459	0,610	0,695	0,763	0,597	0,561	0,695	0,329	0,603	0,423	0,356	<b>0,453</b>



### 3.3.2 HERITABILITÄTEN UND KORRELATIONEN IN DER SPEZIES SCHWEIN

Die Schätzung genetischer Parameter in der Spezies Schwein ergab hohe Heritabilitäten für die verschiedenen Merkmale des Fettstoffwechsels (Tab. 3-3 ff.). So wurde die Erbllichkeit des intramuskulären Fettgehalts (IMF) bei den Mutterrassen mit 0,66 und in der Vatterrasse mit 0,55 geschätzt. Diese Werte liegen etwas höher als die bei SUZUKI et al. [2006] und CAMERON AND ENSER [1991] für Duroc bzw. Duroc und Landrasse mit 0,49 bzw. 0,53 ermittelten Heritabilitäten.

Auch für Einzelfettsäuren und Fettsäuresummen konnten hohe Erbllichkeiten geschätzt werden. Dabei ist die vorliegende Arbeit die erste, in der auch absolute Fettsäuredaten der Parameterschätzung zu Grunde liegen. In den Mutterrassen wurden Heritabilitäten im Bereich von 0,58 bis 0,66 ermittelt. In der Vatterrasse Pietrain konnten Werte von 0,40 bis 0,55 erreicht werden. Generell fielen die Heritabilitäten in der Vatterrasse sowohl bei relativen wie auch absoluten Merkmalen durchschnittlich 0,1 Punkte niedriger aus. Eine Ausnahme bildete in beiden Datensätzen  $\alpha$ -Linolensäure (18:3n-3): Für diese Fettsäure konnte die Erbllichkeit lediglich mit 34 % (MR) bzw. 27% (VR) geschätzt werden. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich in der Untersuchung von CAMERON AND ENSER [1991]. Hier war  $\alpha$ -Linolensäure mit einer Heritabilität von 62 % eine der Fettsäuren mit der höchsten Erbllichkeit.

Für die Desaturase-Indices 16:1/16:0 und 18:1/18:0 und das Verhältnis n-6/n-3 lagen die Erbllichkeiten im unteren Bereich ( $< 0,26$ ).

Die Korrelationen sowohl relativer als auch absoluter Parameter mit dem IMF fielen in Mutter- und Vatterrassen ähnlich hoch aus. Dabei waren phänotypische Korrelationen etwas enger als genetische. Wie in Rindfleisch zeigt sich auch beim Schwein die typischen negativen Korrelationen zwischen relativen, mehrfach ungesättigten Parametern und IMF.

Die bis auf wenige Ausnahmen hohen Erbllichkeiten und die engen genetischen Korrelationen versprechen die Möglichkeit der Verbesserung der Fleischqualität im Bereich Fettgehalt und Fettzusammensetzung durch züchterische Maßnahmen.

**Tab. 3-3:** Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen relativer Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Mutterrassen)

	IMF	18:1c9	18:2	18:3n-3	20:3n-6	20:4	20:5	22:4	22:5n-3	MUFA	PUFA	n-3	n-6	n-6/n-3
IMF	<b>0,659</b>	0,996	-0,991	-0,964	-0,986	-0,984	-0,975	-0,992	-0,979	-	-	-	-	-
18:1c9	0,972	<b>0,641</b>	-0,990	0,967	0,993	0,991	0,980	0,997	0,984	-	-	-	-0,991	-
18:2	-0,957	-0,962	<b>0,638</b>	0,950	0,976	0,974	0,969	0,982	0,981	-0,974	0,982	0,998	0,994	-0,636
18:3n-3	-0,714	-0,746	0,699	<b>0,344</b>	0,965	0,966	0,948	0,965	0,973	-0,976	0,975	0,958	0,961	-0,526
20:3n-6	-0,931	-0,953	0,910	0,688	<b>0,583</b>	0,999	0,991	0,997	0,978	-0,991	0,979	0,984	0,983	-0,567
20:4	-0,926	-0,952	0,917	0,686	0,989	<b>0,595</b>	0,993	0,996	0,973	-0,989	0,976	0,984	0,981	-0,607
20:5	-0,931	-0,943	0,933	0,682	0,961	0,969	<b>0,593</b>	0,986	0,961	-0,977	0,966	0,979	0,981	-0,553
22:4	-0,956	-0,967	0,942	0,699	0,982	0,980	0,966	<b>0,617</b>	0,976	0,992	0,977	0,988	0,983	-0,615
22:5n-3	-0,904	-0,927	0,916	0,807	0,893	0,887	0,874	0,907	<b>0,596</b>	-	-	-	0,990	-0,514
MUFA	-	-	-0,916	-0,717	-0,954	-0,956	-0,921	-0,958	-	<b>0,651</b>	-0,986	-	-0,983	0,565
PUFA	-	-	0,916	0,825	0,884	0,880	0,873	0,900	-	-0,911	<b>0,585</b>	-	0,991	-0,508
n-3	-	-	0,980	0,691	0,925	0,933	0,943	0,952	-	-	-	<b>0,652</b>	0,998	-0,604
n-6	-	-0,960	0,972	0,690	0,928	0,931	0,942	0,948	0,933	-0,936	0,928	0,993	<b>0,661</b>	-0,573
n-6/n-3	-	-	-0,444	-0,304	-0,352	-0,382	-0,394	-0,397	-0,298	0,309	-0,304	-0,433	-0,354	<b>0,259</b>

**Tab. 3-4:** Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen absoluter Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Mutterrassen)

	IMF	16:0	16:1	18:0	18:1c9	18:1c11	SFA	MUFA	14:0	20:0	18:3n-3	20:1	16:1/ 16:0	18:1/ 18:0
IMF	<b>0,658</b>	0,999	0,999	0,995	0,999	0,998	0,998	0,999	0,997	0,993	0,993	0,999	-0,707	0,842
16:0	0,989	<b>0,642</b>	0,999	0,998	1,000	0,997	1,000	0,999	0,999	-	-	-	-0,713	-
16:1	0,981	0,991	<b>0,639</b>	0,995	0,999	0,999	0,998	0,999	-	0,994	-	-	-	0,843
18:0	0,972	0,988	0,975	<b>0,608</b>	0,997	0,992	0,999	0,997	-	-	0,990	-	-0,739	-
18:1c9	0,990	0,998	0,992	0,983	<b>0,646</b>	0,997	0,999	1,000	-	-	-	1,000	-	0,831
18:1c11	0,987	0,988	0,989	0,966	0,993	<b>0,663</b>	0,995	0,998	0,995	-	-	-	-	0,847
SFA	0,986	0,999	0,992	0,988	0,997	0,985	<b>0,636</b>	0,999	-	-	0,992	-	-	0,814
MUFA	0,990	0,997	0,993	0,981	0,999	0,994	0,996	<b>0,644</b>	-	0,955	-	-	-0,716	-
14:0	0,982	0,996	-	-	-	0,986	-	-	<b>0,627</b>	-	-	-	-0,721	0,803
20:0	0,960	-	0,955	-	-	-	-	0,968	-	<b>0,627</b>	-	-	-0,742	0,810
18:3n-3	0,947	-	-	0,943	-	-	0,952	-	-	-	<b>0,618</b>	-	-0,737	0,824
20:1	0,990	-	-	-	0,997	-	-	-	-	-	-	<b>0,652</b>	-	0,830
16:1/16:0	-0,300	-0,299	-	-0,313	-	-	-	-0,272	-0,268	-0,319	-0,289	-	<b>0,109</b>	-0,427
18:1/18:0	0,377	-	0,364	-	0,369	0,408	0,333	-	0,329	0,293	0,306	0,375	0,060	<b>0,216</b>

**Tab. 3-5:** Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen relativer Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Vaterrasse)

	IMF	18:1c9	18:2	18:3n-3	20:3n-6	20:4	20:5	22:4	22:5n-3	MUFA	PUFA	n-3	n-6	n-6/n-3
IMF	<b>0,553</b>	0,999	-0,959	-0,897	-0,968	-0,898	-0,893	-0,983	-0,971	0,986	-	-0,970	-	-
18:1c9	0,918	<b>0,539</b>	-0,966	-0,872	-0,972	-0,909	-0,897	-0,987	-0,969	-	-	-	-	-
18:2	-0,874	-0,911	<b>0,471</b>	0,863	0,964	0,935	0,932	0,958	0,933	-	0,957	0,996	0,982	-
18:3n-3	-0,606	-0,678	0,629	<b>0,266</b>	0,941	0,951	0,924	0,924	0,815	-0,877	0,836	0,892	0,850	-0,294
20:3n-6	-0,822	-0,882	0,818	0,625	<b>0,460</b>	0,976	0,969	0,997	0,918	-0,973	0,940	0,987	0,967	-0,242
20:4	-0,723	-0,831	0,807	0,641	0,956	<b>0,416</b>	0,998	0,958	0,822	-0,905	0,875	0,952	0,914	-0,351
20:5	-0,804	-0,847	0,865	0,643	0,918	0,922	<b>0,506</b>	0,946	0,820	-0,885	0,867	0,943	0,911	-0,306
22:4	-0,903	-0,922	0,878	0,624	0,955	0,896	0,914	<b>0,529</b>	0,935	-0,980	0,955	0,984	0,966	-0,214
22:5n-3	-0,828	-0,878	0,831	0,670	0,801	0,731	0,727	0,840	<b>0,412</b>	-0,978	-	0,939	0,970	0,149
MUFA	0,828	-	-	-0,608	-0,902	-0,879	-0,788	-0,887	-0,854	<b>0,399</b>	-0,983	-0,962	-0,982	-
PUFA	-	-	0,848	0,712	0,803	0,745	0,754	0,841	-	-0,838	<b>0,406</b>	0,959	0,984	0,089
n-3	-0,868	-	0,962	0,615	0,860	0,850	0,880	0,907	0,862	-0,839	0,866	<b>0,451</b>	0,991	-0,192
n-6	-	-	0,942	0,594	0,860	0,822	0,857	0,904	0,890	-0,860	0,889	0,984	<b>0,461</b>	-0,027
n-6/n-3	-	-	-	-0,232	-0,176	-0,301	-0,300	-0,216	-0,033	-	-0,062	-0,295	-0,129	<b>0,228</b>

**Tab. 3-6:** Heritabilitäten (Diagonale), genetische (oberhalb Diagonale) und phänotypische (unterhalb Diagonale) Korrelationen absoluter Fettsäureparameter in Schweinefleisch (Vaterrasse)

	IMF	16:0	16:1	18:0	18:1c9	18:1c11	SFA	MUFA	14:0	20:0	18:3n-3	20:1	16:1/ 16:0	18:1/ 18:0
IMF	<b>0,553</b>	0,994	0,998	0,982	0,994	0,989	0,992	0,994	-	0,974	-	0,996	-	-
16:0	0,974	<b>0,550</b>	0,992	0,994	1,000	0,983	0,999	0,999	-	-	-	-	-	-
16:1	0,957	0,974	<b>0,507</b>	0,978	0,994	0,998	0,988	0,995	0,983	0,978	0,950	0,996	-0,536	0,791
18:0	0,937	0,973	0,934	<b>0,513</b>	0,993	0,961	0,996	0,990	0,997	0,990	0,909	0,991	-0,668	0,678
18:1c9	0,977	0,995	0,981	0,961	<b>0,542</b>	0,985	0,999	1,000	0,997	0,993	0,917	1,000	-0,606	0,751
18:1c11	0,965	0,962	0,980	0,906	0,975	<b>0,508</b>	0,977	0,986	0,968	0,969	0,963	0,988	-0,468	0,821
SFA	0,968	0,998	0,972	0,975	0,993	0,953	<b>0,551</b>	0,998	0,999	0,994	0,908	0,997	-0,643	0,723
MUFA	0,976	0,993	0,983	0,956	0,999	0,979	0,990	<b>0,533</b>	0,995	0,911	0,919	1,000	-0,605	0,766
14:0	-	-	0,969	0,972	0,988	0,946	0,993	0,985	<b>0,520</b>	0,998	0,895	0,995	-0,666	0,726
20:0	0,917	-	0,908	0,937	0,946	0,919	0,939	0,941	0,945	<b>0,491</b>	0,897	0,990	-0,631	0,719
18:3n-3	-	-	0,890	0,847	0,868	0,879	0,869	0,859	0,855	0,792	<b>0,509</b>	0,928	-0,336	0,695
20:1	0,973	-	0,979	0,952	0,993	0,977	0,983	0,989	0,982	0,946	0,876	<b>0,523</b>	-0,588	0,762
16:1/16:0	-	-	-0,052	-0,298	-0,206	-0,083	-0,251	-0,194	-0,233	-0,282	-0,070	-0,175	<b>0,184</b>	-0,132
18:1/18:0	-	-	0,445	0,172	0,424	0,507	0,358	0,434	0,350	0,309	0,327	0,428	0,251	<b>0,156</b>

### 3.3.3 IDENTIFIZIERUNG VON INDIVIDUEN MIT EXTREMER GENETISCHER VERANLAGUNG

Für den zukünftigen Einsatz als Entscheidungskriterium in der Zucht auf verbesserte Fettqualität in **Rindfleisch** sollten Assoziationen zwischen DNA-Varianten und Fettqualitätsparametern untersucht und DNA-Varianten als potentielle Marker bestätigt werden. Die Auswahl der zu diesem Zweck in der vorliegenden Arbeit zu genotypisierenden Tiere sollte anhand von Zuchtwerten erfolgen, da die Zuchtwertschätzung eine Abgrenzung des Einflusses der Genetik von den Umwelteffekten bei der Ausprägung eines Merkmals ermöglicht. Individuen, die sich in ihren Zuchtwerten extrem unterscheiden, stellen ein geeignetes Material dar, um die an der Ausprägung eines Merkmals beteiligten Gene zu untersuchen.

Auf Grund der sehr hohen genetischen Korrelationen zwischen Fettsäureparametern und IMF von durchschnittlich 0,93 (relativ) wurde entschieden, Zuchtwerte für das Merkmal IMF stellvertretend zu schätzen und Individuen mit einer genetischen Veranlagung zur Merkmalsausprägung im Extrembereich mit Hilfe dieses Kriteriums zu identifizieren. Dafür wurden die Tiere entsprechend ihres Zuchtwertes (*estimated breeding value*, EBV) für IMF ( $EBV_{IMF}$ ) rangiert. Für die Genotypisierungen wurden zwei Gruppen ausgewählt, die aus den Fleckvieh-Bullen mit den jeweils 50 niedrigsten bzw. höchsten Zuchtwerten bestanden. In der Gruppe der Tiere mit den niedrigen  $EBV_{IMF}$  lag der durchschnittliche IMF-Zuchtwert bei -0,60 (Tab. 3-7). Die Gruppe, die sich durch extrem hohe  $EBV_{IMF}$  auszeichnete, erreichte einen mittleren Wert von 0,92. Der Unterschied zwischen den Gruppen war statistisch hoch signifikant. Für den mittleren IMF-Gehalt, Marmorierungswerte, sowie alle relativen und absoluten Fettsäureparameter konnten ebenfalls hoch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen verzeichnet werden. Im Mastendgewicht unterschieden sich die Gruppen nicht, was auf eine vergleichbare Schlachtreife hindeutet.

Auch in der Spezies **Schwein** sollte die Identifizierung von Individuen mit extremer genetischer Veranlagung für die Assoziationsstudien anhand von Zuchtwerten erfolgen. Da die Untersuchungen zur Assoziation von DNA-Variationen und Lipidparametern beim Schwein dem Projektpartner TUM (Technische Universität München, Lehrstuhl für Tierzucht) oblagen, erfolgte die Auswahl der Merkmale, für die Zuchtwerte geschätzt werden sollten, in Absprache mit dem Partner. Zuchtwerte und individuelle Identifikationsnummern für die Anforderung der DNA wurden dem Projektpartner zugänglich gemacht.

**Tab. 3-7:** Merkmalsausprägungen in den Bullengruppen  
(Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler)

<b>Merkmal</b>	Gruppe „niedrige EBV <sub>IMF</sub> “ (n = 50)	Gruppe „hohe EBV <sub>IMF</sub> “ (n = 50)	Signifikanz <sup>a</sup>
EBV <sub>IMF</sub>	-0,60 $\pm$ 0,02	0,92 $\pm$ 0,03	***
IMF [%]	1,46 $\pm$ 0,05	4,76 $\pm$ 0,12	***
Marmorierung	2,38 $\pm$ 0,09	3,24 $\pm$ 0,07	***
Mastendgewicht [kg]	643 $\pm$ 7,4	645 $\pm$ 6,6	n.s.
<i>relative Fettsäureparameter [%]</i>			
C18:1c9	31,53 $\pm$ 0,26	36,48 $\pm$ 0,52	***
C18:2 c9,12	8,51 $\pm$ 0,16	3,23 $\pm$ 0,13	***
C18:3 c9,12,15	0,49 $\pm$ 0,01	0,27 $\pm$ 0,01	***
C20:3 c8,11,14	0,50 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,01	***
C20:4 c5,8,11,14	2,26 $\pm$ 0,05	0,88 $\pm$ 0,03	***
C22:4 c7,10,13,16	0,65 $\pm$ 0,01	0,31 $\pm$ 0,01	***
C22:5 c7,10,13,16,19	0,53 $\pm$ 0,01	0,21 $\pm$ 0,01	***
SFA	46,89 $\pm$ 0,26	49,47 $\pm$ 0,44	***
MUFA	38,80 $\pm$ 0,27	44,28 $\pm$ 0,49	***
PUFA	13,28 $\pm$ 0,25	5,98 $\pm$ 0,20	***
$\Sigma$ n-3	1,20 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02	***
$\Sigma$ n-6	12,28 $\pm$ 0,24	5,17 $\pm$ 0,20	***
$\Sigma$ n-6/ $\Sigma$ n-3	10,29 $\pm$ 0,16	11,23 $\pm$ 0,30	**
<i>absolute Fettsäureparameter [mg/100 g Fleisch]</i>			
C14:0	21,94 $\pm$ 1,36	110,68 $\pm$ 3,15	***
C14:1c9	3,13 $\pm$ 0,31	22,78 $\pm$ 0,83	***
C16:0	281,13 $\pm$ 12,42	1077,58 $\pm$ 26,45	***
C16:1c9	25,27 $\pm$ 1,41	121,10 $\pm$ 3,74	***
C18:0	240,38 $\pm$ 8,42	694,43 $\pm$ 15,82	***
$\Sigma$ C18:1 <i>trans</i>	27,14 $\pm$ 0,97	76,81 $\pm$ 1,80	***
C18:1c9	377,05 $\pm$ 16,98	1565,78 $\pm$ 48,04	***
C18:1c11	23,10 $\pm$ 0,75	72,80 $\pm$ 2,55	***
CLA c9 t11	5,57 $\pm$ 0,25	17,26 $\pm$ 0,49	***
C18:3 c9,12,15	6,16 $\pm$ 0,15	8,89 $\pm$ 0,19	***
C22:4 c7,10,13,16	8,11 $\pm$ 0,06	11,39 $\pm$ 0,15	***
SFA	550,75 $\pm$ 22,86	1938,70 $\pm$ 45,54	***
MUFA	454,14 $\pm$ 20,41	1872,04 $\pm$ 57,16	***
PUFA	166,15 $\pm$ 1,58	193,53 $\pm$ 1,35	***
C14:1/C14:0	0,135 $\pm$ 0,009	0,204 $\pm$ 0,003	***
C16:1/C16:0	0,090 $\pm$ 0,003	0,111 $\pm$ 0,001	***
C18:1/C18:0	1,57 $\pm$ 0,04	2,25 $\pm$ 0,04	***

<sup>a</sup> n.s. - nicht signifikant; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001

## 4 TEIL III: UNTERSUCHUNG VON KANDIDATENGENEN FÜR DEN BOVINEN FETTSTOFFWECHSEL

### 4.1 KANDIDATENGENE

Die Identifizierung von Genen als Kandidatengene, die die Qualität tierischer Produkte massgeblich beeinflussen, erfolgte in den Arbeitspaketen 1 und 4 des QuaLIPID-Projektes. Dafür wurden zum einen relevante Stoffwechselwege berücksichtigt (Literaturrecherche) und zum anderen Genexpressionsstudien in Halbgeschwistern, die sich in Merkmalen des Fettstoffwechsels signifikant unterschieden, durchgeführt. Gene, deren Produkte ratenlimitierend wirken oder die Expressionsunterschiede zeigten, wurden als potentielle funktionelle Kandidatengene in QuaLIPID ausgewählt. Positionelle Kandidatengene ergaben sich durch ihre Lokalisation in einem QTL .

#### 4.1.1 ACAD9

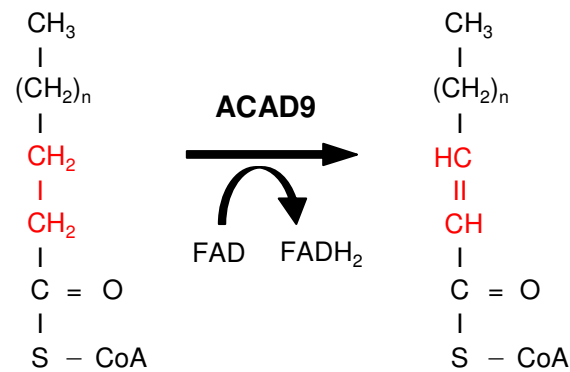
Die Familie der Acyl-CoA-Dehydrogenasen (ACADs) katalysiert den initialen Schritt der mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren [ENSENAUER et al. 2005]. Damit nimmt diese Gruppe von Flavoproteinen eine Schlüsselrolle bei der Energiebereitstellung aus Fettsäuren ein.

ACADs verfügen über eine prosthetische Gruppe (FAD), mit deren Hilfe die Dehydrogenierung der an Coenzym A gebundenen Fettsäure erfolgt (Abb. 4-1). FAD fungiert dabei als Wasserstoff-Akzeptor<sup>11</sup> [EATON et al. 1996]. Der Reaktionsmechanismus ist bei allen Familienmitgliedern sehr ähnlich, die einzelnen Enzyme unterscheiden sich jedoch in ihrer Substratspezifität. ACAD9 ist bevorzugt an der Oxidation von langkettigen Acyl-CoAs (> 16 C-Atome) beteiligt und scheint eine besondere Rolle bei der Metabolisierung ungesättigter Substrate zu spielen [ENSENAUER et al. 2005, ZHANG et al. 2002].

---

<sup>11</sup> genauer: Die Übertragung des Wasserstoffs auf Flavin erfolgt in Form eines Protons und eines Hydridionäquivalent [THORPE AND KIM 1995].





**Abb. 4-1:** Dehydrogenierung von Acyl-CoA zu *trans*-2-Enoyl-CoA durch ACAD9 [nach VOET et al. 2002]

Beim Rind ist das *ACAD9*-Gen in einem Abschnitt auf dem bovinen Chromosom 22 lokalisiert (~ 60,7 Mbp<sup>12</sup>), in dem ein QTL für die Persistenz in der Milchfettmenge beschrieben wurde [HARDER et al. 2006].

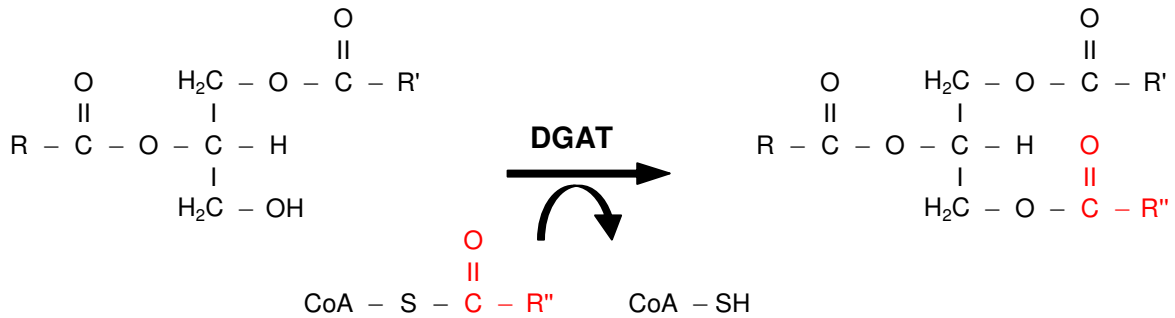
Im FUGATO-Projekt QuaLIPID wurden im bovinen *ACAD9*-Gen 25 Polymorphismen mittels Sequenzierung identifiziert [REICHENEDER et al. in Vorbereitung]. Darunter waren drei SNPs, die in der vorhergesagten Aminosäuresequenz von ACAD9 zu einem Aminosäureaustausch führten (nicht-synonyme SNPs). Ein Großteil der Polymorphismen wurde in Introns beschrieben, wobei ein SNP in Intron 10 durch das fehlende Kopplungsungleichgewicht mit den anderen Polymorphismen auffiel.

REICHENEDER et al. [in Vorbereitung] untersuchten die Assoziationen der nicht-synonymen Austausche und des SNPs in Intron 10 mit den Anteilen diverser *trans*-Fettsäuren in Milch. Dabei zeigten die nicht-synonymen SNPs c.1065G>A und c.1392G>T und der intronische Polymorphismus c.1027-130C>T Effekte auf einzelne *trans*-Fettsäuren inkl. CLA c9 t11, sowie auf die Summe der *trans*-Fettsäuren. Individuen mit dem Genotyp c.1065 GG zeichneten sich gegenüber heterozygoten Tieren durch höhere Gehalte einzelner *trans*-Fettsäuren aus. Der Genotyp c.1065 AA war in dem untersuchten Tiermaterial nicht vertreten. Für den SNP c.1392G>T wurde eine Erhöhung des Gehaltes an CLA t10 c12 in Milch durch das T-Allel beschrieben. Das C-Allel des SNPs c.1027-130C>T in Intron 10 war mit der Erniedrigung der Gehalte einzelner *trans*-Fettsäuren assoziiert.

<sup>12</sup> Lage nach Referenzsequenz in Btau 4.0 [NCBI 2008]

#### 4.1.2 DGAT1

Das Enzym Diacylglycerol-O-Acyltransferase (DGAT, EC 2.3.1.20<sup>13</sup>) katalysiert den finalen Schritt in der Synthese von Triglyceriden (Abb. 4-2). DGAT nimmt damit eine bedeutende Rolle im Lipid- und Energiestoffwechsel ein [CASES et al. 1998].



**Abb. 4-2:** Synthese von Triacylglycerol (Triglycerid): Übertragung eines Acylrestes auf Diacylglycerol durch DGAT [nach VOET et al. 2002]

Das bovine *DGAT1*-Gen ist auf BTA 14 (~ 445 kbp) im Bereich eines QTLs für Milchfettgehalt bzw. Milchfettmenge lokalisiert [BENNEWITZ et al. 2003, BENNEWITZ et al. 2004, HEYEN et al. 1999, KÜHN et al. 2004, THALLER et al. 2003, VIITALA et al. 2003].

WINTER et al. [2002] und GRISART et al. [2002] beschrieben 2002 unabhängig voneinander einen Nukleinsäureaustausch im bovinen *DGAT1*-Gen, der mit dem Milchfettgehalt assoziiert ist. Dabei handelt es sich um eine Dinukleotidsubstitution im Exon 8 (von AA zu GC), die zu einem nicht-konservativen Aminosäureaustausch von Lysin (AA) durch Alanin (GC) in der vorhergesagten Aminosäuresequenz führt (K232A). Die in beiden Untersuchungen mit einem höheren Milchfettgehalt assoziierte Lysin-Variante von *DGAT1* zeigte eine evolutionäre Konservierung in verschiedenen Spezies (u.a. *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Sus scrofa*, *Ovis aries*, *Bison bison*) und ist somit als die ursprüngliche Variante anzusehen [GRISART et al. 2002, WINTER et al. 2002].

Der Austausch der positiv geladenen Aminosäure Lysin (K) durch das neutrale, hydrophobe Alanin (A) dürfte Auswirkungen auf die Struktur und Eigenschaften der Diacylglycerol-O-Acyltransferase haben. WINTER et al. [2002] geben zu bedenken, dass Lysin-Reste wesentliche Interaktionspartner für Coenzym A sind, weshalb bei der Alanin-Variante von *DGAT1* die Acyl-CoA-Bindungskapazität negativ beeinflusst sein könnte. GRISART et al. [2004] konnten zeigen, dass sich die Enzymaktivitäten von DGAT1 in

<sup>13</sup> Enzym-Nomenklatur nach NC-IUBMB [1992]

Abhängigkeit von der in Position 232 eingebauten Aminosäure signifikant unterschieden. Dabei wies die mit höheren Milchfettgehalten assoziierte Lysin-Variante eine deutlich höhere Synthesegeschwindigkeit auf.

Zahlreiche Studien bestätigten den Zusammenhang zwischen dem Austausch K232A in *DGAT1* und der Menge und Zusammensetzung von Milch [GAUTIER et al. 2007, KAUPÉ et al. 2007, NÄSLUND et al. 2008, SANDERS et al. 2006, SCHENNINK et al. 2007, SPELMAN et al. 2002, THALLER et al. 2003b]. In allen Untersuchungen war das K-Allel mit hohen Fettgehalten, Fettmengen und Proteingehalten in der Milch sowie niedrigen Proteinmengen und Milchmengen assoziiert. THALLER et al. [2003a] fanden einen positiven Einfluss der Lysin-Variante auf den intramuskulären Fettgehalt beim Rind.

#### **4.1.3 FASN**

Die Fettsäuresynthase (FASN) ist ein multifunktionseller Enzymkomplex, der die *de novo* Synthese gesättigter Fettsäuren aus Acetyl-CoA und Malonyl-CoA katalysiert. Im finalen Schritt der Fettsäurebiosynthese erfolgt die Abspaltung der synthetisierten Fettsäure vom Acyl-Carrier-Protein durch die Thioesterase. Dieser Schritt dient neben der Freisetzung der Fettsäure auch der Regeneration des Multienzymkomplexes [VOET et al. 2002].

Veränderungen in der die Thioesterasedomäne codierenden Region des *FASN*-Gens können die freigesetzten Fettsäuren in ihrer Länge beeinflussen und dadurch die Bereitstellung von Substraten für Elongasen und Desaturasen modifizieren. Derartige Modifikationen spiegeln sich im Fettsäurespektrum wieder [ZHANG et al. 2008].

Im 3'-terminalen Abschnitt des bovinen *FASN*-Gens, der die Thioesterasedomäne codiert, wurde ein nicht-synonymer SNP (g.17924A>G) beschrieben, der in der vorhergesagten Aminosäuresequenz zum Austausch von Threonin durch Alanin führt [MORRIS et al. 2006, ZHANG et al. 2008]. In einer Studie von ZHANG et al. [2008] zeigte dieser Polymorphismus signifikante Assoziationen mit der Fettsäurezusammensetzung in Rindfleisch. Angus-Bullen, die für das Alanin-codierende G-Allel homozygot waren, wiesen im Vergleich zu Tieren mit dem Genotyp AA signifikant weniger Myristinsäure (C14:0), Palmitinsäure (C16:0) und SFA im *M. long. dorsi* auf, bei gleichzeitig signifikant höheren Ölsäure- (C18:1c9) und MUFA-Gehalten.

Neben dem funktionellen Aspekt qualifiziert sich *FASN* auch durch seine Lage im Bereich eines QTLs für Milchfettmenge [BOICHARD et al. 2003] auf BTA 19 (~ 52,2 Mbp) als Kandidatengen.

#### 4.1.4 PPARGC1A

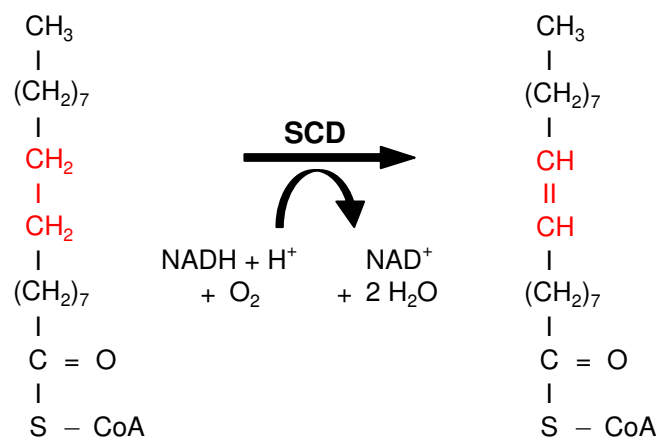
Der Koaktivator PPARGC1A (*peroxisome proliferator-activated receptor-γ coactivator 1α*, auch: PGC-1α) ist in zahlreiche Prozesse des Energiehaushaltes, der Thermoregulation und des Glucosemetabolismus involviert [FINCK AND KELLY 2006, LIN et al. 2005, PUIGSERVER AND SPIEGELMAN 2003]. Über die Aktivierung einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren moduliert PPARGC1A die Expression von Genen, deren Produkte u.a. die Energiebereitstellung, Adipogenese, adaptive Thermogenese [PUIGSERVER et al. 1998] und Gluconeogenese [SCHILLING et al. 2006, YOON et al. 2001] beeinflussen. So ist PPARGC1A beispielsweise Koaktivator des Kernrezeptors PPARα, der die Transkription von Genen, die Enzyme der mitochondrialen β-Oxidation von Fettsäuren codieren, kontrolliert [VEGA et al. 2000]. Durch die Wechselwirkung mit PPARγ beeinflusst PPARGC1A maßgeblich die Differenzierung von Adipozyten und damit die Ausbildung von Fettgewebe [LOWELL 1999, ROSEN et al. 1999].

Auf Grund der Schlüsselrolle von PPARGC1A im Energie-, Fett- und Glucosestoffwechsel und der Lage des Gens auf BTA 6 (~ 44,8 Mbp) identifizierten WEIKARD et al. [2005] das bovine *PPARGC1A*-Gen als funktionelles und positionelles Kandidatengens für einen QTL, für den ein Einfluss auf die Milchfettmenge nachgewiesen worden war [ASHWELL et al. 2004, FREYER et al. 2003, KÜHN et al. 1999, NADESALINGAM et al. 2001, OLSEN et al. 2004, ZHANG et al. 1998]. In ihrer Untersuchung beschreiben WEIKARD et al. [2005] 11 Polymorphismen, darunter einen SNP (c.1847C>T), der zu einem Austausch in der vorhergesagten Aminosäuresequenz von PPARGC1A (p.P616L) führt. Die Assoziationsstudien zwischen den *PPARGC1A*-Genvarianten und den Zuchtwerten für die Merkmale Milchmenge, Milchfettgehalt und Milchfettmenge in Deutschen Holstein zeigten jedoch keinen signifikanten Effekt dieses nicht-konservativen SNPs. Allerdings konnte für einen Austausch im Intron 9 (c.1892+19C>T) ein Zusammenhang mit der Milchfettmenge nachgewiesen werden. Dabei ergab die Untersuchung innerhalb von Halbgeschwisterfamilien eine signifikante Assoziation des C-Allels mit einer geringeren Milchfettmenge. Tiere mit dem Genotyp CC wiesen eine signifikant geringere Milchfettmenge auf als Artgenossen mit wenigstens einem T-Allel. Obwohl es sich bei diesem SNP um einen intronischen Polymorphismus handelt, der zu keiner Änderung in der Aminosäuresequenz von PPARGC1A führt, wäre dieser Austausch als Ursache für den QTL auf BTA 6 denkbar, da Sequenzmotive in Introns eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression spielen können [LE HIR et al. 2003, VAN LAERE et al. 2003]. So scheint die Variation in komplexen Merkmalen öfter durch Polymorphismen in nichtkodierenden Bereichen verursacht zu werden als durch Varianten der kodierenden Sequenz [GLAZIER et al. 2002].

#### 4.1.5 SCD1

Die Synthese ungesättigter Fettsäuren erfolgt in Eukaryonten durch Desaturasen. Je nach Position, an der die Doppelbindung eingefügt wird, unterscheidet man in Säugetieren zwischen  $\Delta 4$ -,  $\Delta 5$ -,  $\Delta 6$ - und  $\Delta 9$ -Desaturasen. Die Synthese einer Doppelbindung zwischen 12. und 13. ( $\Delta 12$ ) bzw. 15. und 16. ( $\Delta 15$ ) Kohlenstoffatom ist in Säugetieren nicht möglich. Linolsäure ( $\Delta 9,12$ -Octadecadiensäure) und  $\alpha$ -Linolensäure ( $\Delta 9,12,15$ -Octadecatriensäure) sind somit essentielle Fettsäuren, die mit der Nahrung aufgenommen werden müssen [VOET et al. 2002].

Stearoyl-CoA-Desaturase (SCD, EC 1.14.99.5) ist das ratenlimitierende Enzym in der Synthese von einfach ungesättigten Fettsäuren (MUFA) aus gesättigten Fettsäuren (SFA) (Abb. 4-3). Die bevorzugten Substrate dieser  $\Delta 9$ -Desaturase sind CoA-gebundene Stearinsäure (C18:0) und Palmitinsäure (C16:0), welche durch das Einfügen einer Doppelbindung zwischen 9. und 10. Kohlenstoff-Atom in Ölsäure (C18:1) bzw. Palmitoleinsäure (C16:1) umgewandelt werden [NTAMBI AND MIYAZAKI 2004]. Aber auch die Menge von CLA c9 t11 wird durch die  $\Delta 9$ -Desaturase beeinflusst. CORL et al. [2001] konnten zeigen, dass ein wesentlicher Teil der im Milchfett vorkommenden CLA c9 t11 nicht durch Pansenmikroorganismen, sondern endogen durch  $\Delta 9$ -Desaturase synthetisiert wird.



**Abb. 4-3:** Desaturierung von Stearoyl-CoA durch SCD  
[nach VOET et al. 2002]

Das bovine *SCD1*-Gen scheint auf BTA 26 lokalisiert zu sein [CAMPBELL et al. 2001]. TANIGUCHI et al. [2004] beschrieben einen SNP im bovinen *SCD1*-Gen, der beim Japanischen Schwarzen Rind mit dem Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren im IMF

assoziiert war. Dabei handelte es sich um eine Transition von Thymin durch Cytosin (c.878T>C), die in der vorhergesagten Aminosäuresequenz zu einem Austausch von Valin durch Alanin (p.293V>A) führen würde. Tiere mit dem C-Allel (Alanin-Variante des Proteins) zeigten dabei IMF mit höherem MUFA-Anteil und niedrigerem Schmelzpunkt. Auf dem japanischen Rindfleischmarkt, wo stark marmoriertes Fleisch bevorzugt wird, ist ein hoher Anteil einfach ungesättigter Fettsäuren im intramuskulären Fett von Rindern erwünscht, da dadurch ein niedrigerer Schmelzpunkt des Fettes bewirkt wird, was wesentlich zu Schmackhaftigkeit des Fleisches beiträgt [MITSUHASHI 2008, MELTON et al. 1982].

Die Valin-Variante der Stearoyl-CoA-Desaturase ist in Säugetieren hochkonserviert, weshalb Valin die ursprüngliche Aminosäure an Position 293 im SCD1-Protein darstellt [TANIGUCHI et al. 2004]. Das Vorkommen der neueren Alanin-Variante ist in den einzelnen Rinderrassen sehr unterschiedlich. In den von TANIGUCHI et al. [2004] untersuchten Japanischen Schwarzen Rindern betrug die Frequenz des den Einbau von Alanin bewirkenden C-Allels 0,59. In amerikanischen Rindern der Iowa State University konnte lediglich eine Häufigkeit des C-Allels von 0,17 ermittelt werden [ZHANG et al. 2005]. Homozygote CC-Tiere kamen in dieser Untersuchung nicht vor. Eine Studie an Tieren der Milchviehrassen Kanadische Holstein und Jersey ergab C-Allelfrequenzen von 0,83 und 0,95 [KGWATALALA et al. 2007]. Deutlich höhere Frequenzen des C-Allels konnten auch in italienischen Milchviehrassen (0,89 - 0,62) beim Vergleich mit Fleischrassen (0,66 - 0,34) festgestellt werden [MILANESI et al. 2008].

#### **4.1.6 TG**

Das Protein Thyroglobulin ist die Vorstufe der Schilddrüsenhormone Triiodthyronin (T3) und Thyroxin (T4). Schilddrüsenhormone spielen eine wichtige Rolle in der Wachstumsphase eines Organismus und sind an der Regulation des Stoffwechsels und der Funktion zahlreicher Gewebe beteiligt. Einer der Wirkorte der Schilddrüsenhormone ist das Fettgewebe, wo sie maßgeblich die Differenzierung von Adipozyten beeinflussen [OBREGON et al. 2008].

Zum Fettgewebe zählen neben subkutanen, visceralen und retroperitonealen Fettdepots auch intramuskuläre Fetteinlagerungen. Diese sind im Muskelquerschnitt als weiße Flächen erkennbar und stellen ein wichtiges Kriterium der Fleischqualität dar: die Marmorierung.

William J. BARENDSE [1997] identifizierte einen Polymorphismus in der 5' untranslatierten Region (5'UTR) des Thyroglobulin-Gens (*TG*), der signifikant mit dem Merkmal Marmorierung assoziiert war. Hierbei handelte es sich um eine Transition von Cytosin gegen Thymin, 537 Basen vor dem Beginn des ersten Exons (c.-537C>T). Tiere, die über das T-Allel verfügten (Genotypen TT und CT), wiesen signifikant höhere Marmorierungswerte auf als Rinder mit dem Genotyp CC.

Die Eignung dieses Austausches als Marker für Marmorierung wurde in einer Studie mit 1750 Rindern validiert [BARENDSE et al. 2004]. Im Jahr 2000 erfolgte die Markteinführung des GeneSTAR Marbling-Tests (*Genetic Solutions*, heute *Catapult Genetics*) durch den eine Aussage über die genetische Prädisposition eines Rindes, Fleisch mit hohen Marmorierungswerten auszubilden, möglich sein sollte. Anfangs basierte der Test ausschließlich auf dem von BARENDSE [1997] identifizierten SNP im *TG*-Gen [GENETIC SOLUTIONS 2001]. Er wurde jedoch kontinuierlich weiterentwickelt und besteht gegenwärtig aus einem Panel von 4 Markern, die mit Marmorierung assoziiert sind [CATAPULT GENETICS 2008].

Neben der in der Literatur beschriebenen Assoziation des SNPs c.-537C>T mit dem Fleischqualitätsmerkmal Marmorierung macht auch die Lokalisation im Rinder genom *TG* als Kandidatengen interessant. Das bovine *TG*-Gen liegt auf BTA 14 (~ 7,8 Mbp) im Bereich eines QTLs für den Fettgehalt in Milch [ASHWELL et al. 2004, BOICHARD et al. 2003, VIITALA et al. 2003].

## 4.2 MATERIAL UND METHODEN

### 4.2.1 TIERE

Die molekulargenetischen Untersuchungen erfolgten am genetischen Material von 100 Fleckvieh-Bullen, die sich durch extrem niedrige bzw. hohe IMF-Zuchtwerte auszeichneten (vgl. Teil II). Die Tiere waren unter standardisierten Mastbedingungen gemäß den Richtlinien für die Nachkommenprüfung an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft zwischen 2004 und 2007 gehalten worden (vgl. Abschnitt 2.2.1.1).

**Probennahme.** Während der Phase des Entblutens bei der Schlachtung wurden etwa 40 ml Blut zur Gewinnung von DNA für molekulargenetische Untersuchungen in Falconröhrchen abgefüllt. In den Röhrchen lag 1,5 ml EDTA (0,5 M; pH 8,0) als Antikoagulanzen vor. Bis zur DNA-Isolation wurde das Blut bei -20 °C gelagert.

### 4.2.2 PROBENVORBEREITUNG – DNA-ISOLATION AUS BLUT

Die in dieser Arbeit eingesetzten bovinen DNAs waren im molekulargenetischen Labor des Institutes für Tierzucht der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft durch Frau J. Semmer nach dem Protokoll von BUITKAMP et al. [1999] isoliert worden. Dafür wurden 10 ml des mit EDTA-stabilisierten Vollblutes mit 30 ml bidestilliertem Wasser vermischt. Anschließend wurden 5 ml 1,8 %-iger Natriumchloridlösung hinzugegeben, geschwenkt und 20 min bei 4.000 x g und 10 °C zentrifugiert (Zentrifuge Z 513 K, *Hermle*). Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das Röhrchen mit dem Pellet bis zur 35 ml-Marke mit 0,1%-igem NP40 aufgefüllt. Durch Schütteln auf einem Vortex-Mixer erfolgte die Resuspendierung des Pellets, an die sich ein weiterer Zentrifugationsschritt für 20 min bei 6.000 x g und 10 °C anschloss. Nach dem Abgießen des Überstandes wurde das Pellet mit 2,5 ml PK-Puffer, 50 µl Proteinase K und 200 µl SDS versetzt, kurz gemixt und ≥ 12 h bei 56 °C unter Schütteln inkubiert.

Nach Zugabe von 2,5 ml 5 M Natriumchloridlösung wurde das Röhrchen geschüttelt und 20 min bei 7.000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 5,5 ml Isopropanol versetzt. Durch leichtes Schwenken fiel die DNA aus.



Die DNA wurde in ein 1,5-ml Eppendorfgefäß überführt, mit 1 ml 70%-igem Ethanol vermischt und 10 min bei 10.000 x g zentrifugiert (Zentrifuge 5415 D, *Eppendorf*). Dieser Waschschrift erfolgte insgesamt dreimal. Anschließend wurde das Pellet getrocknet. Zum Schluss erfolgte die Zugabe von 200 µl TE-Puffer. Zur vollständigen Resuspendierung wurde die DNA mehrere Tage bei 4 °C inkubiert.

### 4.2.3 MOLEKULARGENETISCHE TECHNIKEN

Soweit sie nicht als Fertiglösungen verwendet wurden (s. Anhang), erfolgte die Anfertigung aller in diesem Kapitel angegebenen Reagenzien und Puffer gemäß den Vorgaben von SAMBROOK et al. [1989].

#### 4.2.3.1 PCR

Zur Verwendung für die PCR wurde die DNA auf eine Konzentration von 20 ng/µl mit TE-Puffer (pH 8,0) eingestellt. Der DNA-Gehalt wurde photometrisch mit einem NanoDrop (*Thermo Scientific*) ermittelt. Dabei wurden die Absorptionen bei 260 nm (DNA) und 280 nm (Protein) gemessen. Der Quotient aus  $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$  diente als Anhaltspunkt für die Reinheit der DNA. Idealerweise sollten Quotienten > 1,8 erreicht werden. Deutlich niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin und eine zuverlässige Quantifizierung der DNA-Menge ist nicht möglich [SAMBROOK et al. 1989].

Das Design der Primer erfolgte mit den Programmen Primer3 [ROZEN AND SKALETZKY 2000] und BatchPrimer3 [YOU et al. 2008] basierend auf den über öffentliche Datenbanken zugänglichen Gen-Referenzsequenzen (für *GenBank accession numbers* s. Anhang). Die Synthese der Primer wurde bei der Firma *Metabion* (Martinsried, Deutschland) in Auftrag gegeben. Die lyophilisierten Primer wurden in Tris-Puffer (pH 8,0) gelöst und zur Verwendung auf 10 µM verdünnt. Aus Primern, PCR-Puffer (*Quiagen*), Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs), bidestilliertem Wasser und DNA-Polymerase (*Quiagen*) wurde ein Mastermix angesetzt (Tab. 4-1). Zu 1 µl DNA wurden 9 µl Mastermix pipettiert und gemixt. Das endgültige PCR-Volumen lag bei 10 µl.

**Tab. 4-1:** Pipettierschema PCR (1-fach, Endvolumen: 10 µl)

	Konzentration	Volumen
PCR-Puffer	10 x	1 µl
dNTPs	jeweils 2 mM	0,5 µl
Primer (forward/ reverse)	10 µM	je 0,5 µl
H <sub>2</sub> O	-	6,45 µl
HotStarTaq DNA Polymerase	5 U/µl	0,05 µl
DNA	20 ng/µl	1 µl

Die allgemeinen PCR-Bedingungen sind in Tabelle 4-2 dargestellt. Die Amplifikation erfolgte in 30 Zyklen. Die optimale Annealingtemperatur der Primer wurde zuvor mit einer Gradienten-PCR bestimmt. Primersequenzen und zugehörige Temperaturen sind im Anhang angegeben.

**Tab. 4-2:** PCR-Bedingungen (30 Zyklen der Schritte 2 - 4)

	Temperatur	Zeit
Heizdeckeltemperatur	100 °C	
1. Schritt: Taq-Aktivierung	95 °C	15 min
2. Schritt: Denaturierung	96 °C	30 s
3. Schritt: Annealing	Primer-spezifisch	1 min
4. Schritt: Extension	72 °C	1 min
5. Schritt: finale Extension	72 °C	3 min
6. Schritt: Kühlung	4 °C	~

} 30 x

#### 4.2.3.2 Sequenzierung

Um abschätzen zu können, ob ein SNPs in den zu untersuchenden Tieren vorkommt und um ggf. weitere Polymorphismen zu identifizieren, wurden die Tiere mit den jeweils 3 niedrigsten bzw. höchsten Zuchtwerten sowie DNA-Pools (20 ng/µl) der in der Rangierung jeweils folgenden 10 Tiere vergleichend sequenziert.

Im ersten Schritt für die Sequenzierung erfolgte die Vervielfältigung des gewünschten DNA-Abschnittes mittels PCR. Um eine ausreichende Menge PCR-Produkt zu erhalten,

wurde der doppelte Ansatz (20 µl) des unter 4.2.3.1 beschriebenen Protokolls pipettiert. Dabei kamen 1,5 U (0,30 µl) der HotStarTaq-Polymerase zum Einsatz. Im Anschluss fand die Aufreinigung des PCR-Produktes mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (*Qiagen*) statt.

Die Sequenzier-Reaktion (Amplifizierung unter Einbau markierter Nucleotide) erfolgte unter Verwendung des BigDye Terminator v2.0 Cycle Sequencing Kit (*Applied Biosystems*). Zur Aufreinigung der Extensionsprodukte wurde der BigDye X Terminator Purification Kit (*Applied Biosystems*) eingesetzt. Die Sequenzierung fand mit einem ABI prism 3100-Avant Genetic Analyser (*Applied Biosystems*) statt. Zur Auswertung der Sequenzen wurde die Software SeqScape v2.1 (*Applied Biosystems*) genutzt. Die Charakterisierung der Allelverteilung in den DNA-Pools erfolgte optisch anhand der Elektropherogramme (Peakhöhe).

#### **4.2.3.3 Methoden zur Typisierung**

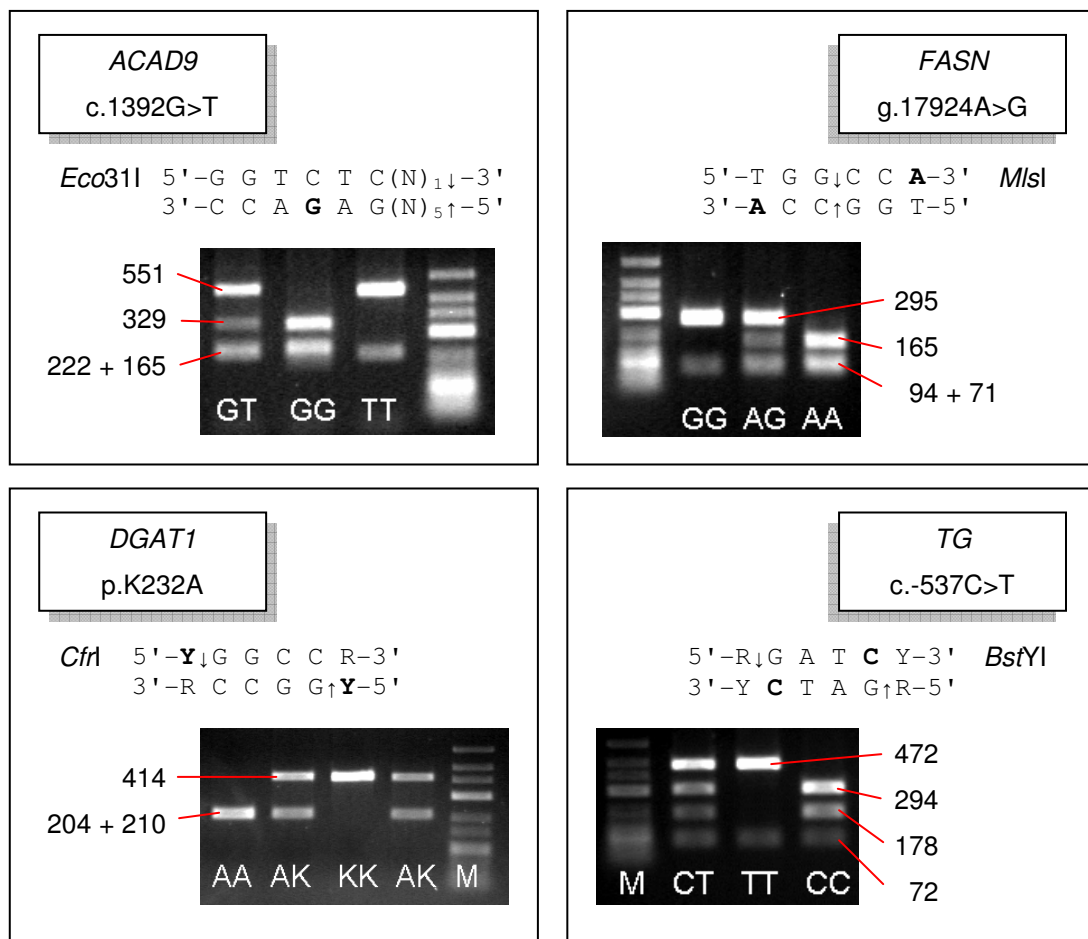
Für die Typisierung der SNPs wurde zum einen das PCR-RFLP-Verfahren (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism*) genutzt. Die dabei eingesetzten Restriktionsenzyme mit ihren spezifischen Erkennungssequenzen sowie den zugehörigen DNA-Fragmenten sind in Abbildung 4-4 dargestellt. Die Auswahl der Restriktionsenzyme erfolgte mit Hilfe des Programms NEBcutter v2.0 [VINCZE et al. 2003]. Das Pipettierschema und die Reaktionsbedingungen enthält Tabelle 4-3. Alle Systeme wurden bei 37 °C mit einer Reaktionszeit von 2 h eingesetzt.

Als weiteres Verfahren zur Typisierung kam die tetra-primer ARMS-PCR [YE et al. 2001] zum Einsatz. Die in der vorliegenden Arbeit entwickelten Systeme sind in Abbildung 4-5 dargestellt. Bis auf die Primer wurden die einzelnen PCR-Komponenten entsprechend Tabelle 4-1 pipettiert. Die eingesetzten Volumina der ARMS-PCR-Primer enthält Tabelle 4-4. Primersequenzen und Reaktionstemperaturen sind im Anhang aufgeführt.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mit Agarose-Gel-Elektrophorese. Dafür wurden 5 µl Probe mit 4 µl Gelladepuffer auf Ethidiumbromid-haltige<sup>14</sup> Agarose-Gele aufgetragen. Der Agarosegehalt der Gele lag je nach Länge der zu trennenden DNA-Fragmente bei 2 (< 700 pb) bzw. 2,5 % (< 500 pb). Als Laufmittel kam TAE-Puffer (s. Anhang) zum Einsatz. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für ca. 20 min durchgeführt. Als Längenmarker diente die GeneRuler DNA Ladder ‚Low Range‘ (*Fermentas*).

---

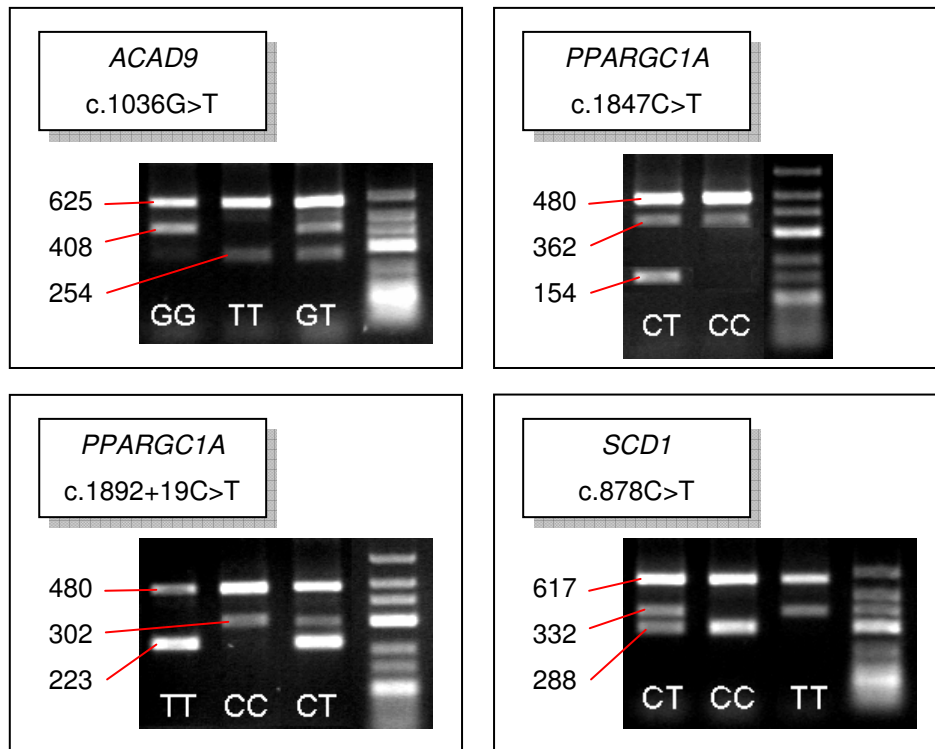
<sup>14</sup> Ethidiumbromid-Gehalt: 75 ppm



**Abb. 4-4:** RFLP-Systeme für die Typisierung von SNPs in *ACAD9*, *DGAT1*, *FASN* und *TG*

**Tab. 4-3:** Pipettierschema für den Restriktionsverdau

	<i>ACAD9</i> c.1392G>T	<i>DGAT1</i> p.K232A	<i>FASN</i> g.17924A>G	<i>TG</i> c.-537C>T
Mastermix				
Restriktionsenzym [μl]	0,5 (5 U)	0,5 (5 U)	0,25 (1,25 U)	0,5 (5 U)
Puffer [μl]	1,0	1,0	0,5	1,0
A. bidest [μl]	7,0	4,5	4,5	4,5
	8,5	6,0	5,25	6,0
+ PCR [μl]	6,0	4,0	2,5	4,0



**Abb. 4-5:** Typisierung von SNPs in *ACAD9*, *PPARGC1A* und *SCD1* nach dem tetra-primer ARMS-PCR-Verfahren

**Tab. 4-4:** Primervolumina für die tetra-primer ARMS-PCR

	<i>ACAD9</i> c.1036G>T	<i>PPARGC1A</i> c.1847C>T	<i>PPARGC1A</i> c.1892+19C>T	<i>SCD1</i> c.878C>T
outer forward	0,3	0,1	0,1	0,1
outer reverse	0,1	0,1	0,1	0,1
inner forward	0,4	0,5	0,5	0,4
inner reverse	0,6	0,5	0,5	0,4
A. bidest	6,05	6,25	6,25	6,45

#### 4.2.4 STATISTISCHE AUSWERTUNG

Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen den selektierten Bullengruppen (Nullhypothese  $H_0$ : die Genotypenverteilung zwischen den beiden Gruppen unterscheidet sich nicht) wurden mit dem Chi-Quadrat-Test in Microsoft Excel [MICROSOFT 2000] evaluiert. Dafür erfolgte anhand der über alle Tiere ermittelten Gesamttallelfrequenzen die Berechnung der zu erwartenden Genotypenverteilung, die dann zur Bestimmung der Chi-Quadrat-Beiträge mit den tatsächlichen Genotypenverteilungen verrechnet wurde.

Mit Hilfe eines weiteren Chi-Quadrat-Tests wurde überprüft, ob die Gesamtheit der Genotypen im Hardy-Weinberg-Gleichgewicht<sup>15</sup> (HWG) vorlagen, um die für den Chi-Quadrat-Test zur Evaluierung der Genotypenverteilung in den beiden Gruppen erforderlichen Freiheitsgrade zu bestimmen (HWG: 1 FG, kein HWG: 2 FG).

Die Wahrscheinlichkeit ( $1-\alpha$ ) für  $H_0$  wurde dann mit der Funktion CHIVERT anhand des Chi-Quadrat-Wertes (Summe der Chi-Quadrat-Beiträge) bei entsprechenden Freiheitsgraden ermittelt.

---

<sup>15</sup> Hardy-Weinberg-Gesetz: Sind die Genfrequenzen zweier Allele in der Elterngeneration  $p$  und  $q$ , so ergeben sich in der Nachkommengeneration Genotypfrequenzen von  $p^2$ ,  $2pq$  und  $q^2$  [FALCONER 1984].

## 4.3 ERGEBNISSE

Die im QuaLIPID-Projekt identifizierten DNA-Variationen sollten in der vorliegenden Arbeit in Fleckvieh-Bullen untersucht werden, deren genetische Veranlagung die Ausprägung von Merkmalen des Fettstoffwechsels in extremen Bereichen begünstigt. Um abschätzen zu können, ob ein Austausch in den zu untersuchenden Bullen vorhanden ist und ob ein potentieller Unterschied in den Allelfrequenzen zwischen Tieren mit signifikant verschiedener Merkmalsausprägung besteht, wurden aus den entsprechend ihrer Zuchtwerte für IMF rangierten Bullen die Tiere mit den 3 höchsten bzw. niedrigsten Zuchtwerten zur vergleichenden Sequenzierung ausgewählt. Die DNA der in der Rangierung jeweils folgenden 10 Tiere wurde gepoolt und ebenfalls sequenziert. Polymorphismen, die in diesen Proben Unterschiede in der Genotypen-/Allelverteilung zeigten und somit divergente Genotypenfrequenzen in den selektierten Bullengruppen erwarten ließen, wurden zur Typisierung in den 100 Bullen ausgewählt. Ausserdem wurden der in einem weit verbreiteten Gentest für Marmorierung enthaltene Austausch im *TG*-Gen sowie der mit dem Fettgehalt in Milch und Fleisch assoziierte Polymorphismus K232A im *DGAT1*-Gen in den beiden Gruppen untersucht.

### 4.3.1 SEQUENZIERUNG

Die Sequenzierung der von REICHENEDER et al. [in Vorbereitung] in **ACAD9** identifizierten Austausche zeigte für zwei der nicht-synonymen SNPs (c.1036G>T und c.1392G>T) geringe Unterschiede in der Allelverteilung in der gepoolten DNA. Bei beiden Polymorphismen war im Pool der Tiere mit den hohen IMF-Zuchtwerten der Peak des G-Allels höher als in dem DNA-Pool der Tiere mit den niedrigen IMF-Zuchtwerten (Tab. 4-5). Der dritte nicht-synonymen SNP (c.1065G>A) und der intronischen SNP (c.1027-130C>T) waren in den untersuchten Tieren nicht polymorph.

Für den Austausch im **FASN**-Gen wurde in allen Einzeltieren aus der Gruppe mit den hohen IMF-Zuchtwerten der Genotyp GG sequenziert (Tab. 4-5). Zwei Bullen aus der Gruppe mit den niedrigen  $EBV_{IMF}$  wiesen den heterozygoten Genotyp AG auf. Für das A-Allel homozygote Individuen kamen nicht vor. Die Tiere in beiden Pools waren homozygot für das G-Allel.

Die Sequenzierung des Austausches c.1847C>T im **PPARGC1A**-Gen ergab das ausschliessliche Vorkommen des C-Allels in dem Pool und den Einzeltieren aus der Gruppe mit den niedrigeren IMF-Zuchtwerten (Tab. 4-5). Aus der Gruppe mit den hohen EBV<sub>IMF</sub> zeigten zwei Tiere den homozygoten Genotyp CC, ein Tier war heterozygot. Der Pool der Gruppe mit den hohen EBV<sub>IMF</sub> wies beide Allele auf, wobei der Peak des T-Allels niedriger ausfiel.

Der SNP im Intron 9 von **PPARGC1A** (c.1892+19C>T) zeigte in allen Einzeltieren den homozygoten Genotyp CC. In den Pools waren beide Allele vertreten, wobei die Höhe des Peaks des T-Allels im Pool der Gruppe mit den niedrigen EBV<sub>IMF</sub> deutlich geringer war.

Für den Austausch im **SCD1**-Gen konnten alle drei in der Literatur beschriebenen Genotypen bereits in den wenigen Einzeltieren sequenziert werden (Tab. 4-5). Der heterozygote Genotyp war dabei ausschließlich in Tieren mit hohen IMF-Zuchtwerten vertreten. Zwei Kopien des C-Allels wies nur ein Tier aus der Gruppe mit den niedrigen EBV<sub>IMF</sub> auf. Die DNA-Pools zeigten die Allele C und T, wobei das C-Allel in beiden Pools höhere Peaks aufwies.

**Tab. 4-5:** Sequenzierung von SNPs in Individuen mit extremen EBV<sub>IMF</sub> und DNA-Pools (in gepoolter DNA höhere Präsenz des fett geschriebenen Allels)

	N1 <sup>a</sup>	N2 <sup>a</sup>	N3 <sup>a</sup>	NP <sup>a</sup>	HP <sup>b</sup>	H3 <sup>b</sup>	H2 <sup>b</sup>	H1 <sup>b</sup>
<b>ACAD9</b>								
c.1027-130 C>T	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT	TT
c.1027-126 C>T	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
c.1027-109 G>A	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
c.1027-103 A>G	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
c.1036 G>T	TT	GT	TT	GT	<b>GT</b>	GT	TT	TT
c.1065 G>A	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
c.1392 G>T	TT	GT	TT	<b>GT</b>	<b>GT</b>	GT	TT	TT
<b>FASN</b>								
g.17924 A>G	GG	AG	AG	GG	GG	GG	GG	GG
<b>PPARGC1A</b>								
c.1847 C>T	CC	CC	CC	CC	<b>CT</b>	CT	CC	CC
c.1892+19 C>T	CC	CC	CC	<b>CT</b>	CT	CC	CC	CC
<b>SCD1</b>								
c.878 C>T	TT	CC	TT	<b>CT</b>	<b>CT</b>	CT	CT	TT

<sup>a</sup> N1 - 3: Tiere mit niedrigsten EBV<sub>IMF</sub>, NP: DNA-Pool niedrige EBV<sub>IMF</sub>

<sup>b</sup> H1 - 3: Tiere mit höchsten EBV<sub>IMF</sub>, HP: DNA-Pool hohe EBV<sub>IMF</sub>



### 4.3.2 TYPISIERUNG

Die Typisierung der SNPs im **ACAD9**-Gen ergab sowohl für den Austausch c.1036G>T als auch für c.1392G>T keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung in den Bullengruppen (Tab. 4-6). Bei beiden Austauschen waren die Frequenzen für den Genotyp GG in den Gruppen jeweils identisch. Den heterozygoten Genotyp wiesen in der Gruppe mit den hohen IMF-Zuchtwerten bei beiden Austauschen nur zwei Tiere mehr auf als in der Gruppe mit den niedrigen  $EBV_{IMF}$ . Ein umgekehrtes Bild war demnach für die TT-Genotypen zu verzeichnen.

Die Genotypenverteilung des bei THALLER et al. [2003a] mit einer positiven Beeinflussung des IMF-Gehaltes in Verbindung gebrachten Austausches K232A im **DGAT1**-Gen zeigte keinen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Bullengruppen (Tab. 4-6). In beiden Gruppen wies ein Großteil der Tiere den Genotyp AA auf. Lediglich vier Tiere zeigten in der Gruppe mit den niedrigen IMF-Zuchtwerten den heterozygoten Genotyp AK, homozygote KK-Tiere traten nicht auf. In der Gruppe mit den hohen  $EBV_{IMF}$  waren fünf Tiere heterozygot und ein Bulle wies zwei K-Allele auf.

Die Typisierung der SNPs im **FASN**-Gen ergab eine annähernd identische Verteilung der Genotypen in den Bullengruppen (Tab. 4-6). Die beiden Gruppen unterschieden sich lediglich in zwei Tieren. Auffallend war das geringe Vorkommen des Genotyps AA. Nur einer der untersuchten einhundert Bullen zeigte zwei A-Allele.

Die Verteilung der Genotypen für den Austausch c.1847C>T im **PPARGC1A**-Gen war zwischen den beiden Bullengruppen signifikant verschieden (Tab. 4-6). In der Gruppe mit den niedrigen IMF-Zuchtwerten war fast ausschließlich der Genotyp CC vertreten (0,98), während in der Gruppe mit den hohen  $EBV_{IMF}$  eine deutlich höhere Frequenz des Genotyps CT (0,16) beobachtet werden konnte. Der für das T-Allel homozygote Genotyp kam in keiner der beiden Gruppen vor.

Für den SNP im Intron 9 von **PPARGC1A** (c.1892+19C>T) war kein signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen den Gruppen zu verzeichnen. In beiden Gruppen war zu einem Großteil der Genotyp CC vertreten (0,78 und 0,80). Bis auf einen für das T-Allel homozygoten Bullen aus der Gruppe mit den hohen  $EBV_{IMF}$  wiesen die restlichen Tiere den heterozygoten Genotyp auf.

Der Vergleich der **SCD1**-Genotypenverteilung in den beiden Bullengruppen zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 4-6). Tendenziell waren in der Gruppe mit den hohen IMF-Zuchtwerten mehr Tiere des Genotyps CC vertreten (0,26 vs. 0,16). Unter den

Bullen mit niedrigen  $EBV_{IMF}$  fanden sich mehr für das T-Allel homozygote Tiere (0,24 vs. 0,12). Der Anteil des heterozygoten Genotyps war nahezu identisch.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Bullengruppen konnte auch nicht bezüglich der **TG**-Genotypenfrequenzen festgestellt werden (Tab. 4-6). In den homozygoten Genotypen CC und TT unterschieden sich die Gruppen nur um jeweils ein Tier, der CT-Genotyp kam in beiden Gruppen im gleichen Umfang vor.

**Tab. 4-6:** Genotypenfrequenzen in den Bullengruppen

Genotypen		Gruppe „niedrige $EBV_{IMF}$ “ (n = 50)	Gruppe „hohe $EBV_{IMF}$ “ (n = 50)	Signifikanz- niveau <sup>a</sup>
<i>ACAD9</i> c.1036 G>T	GG	0,18	0,18	n.s.
	GT	0,54	0,58	
	TT	0,28	0,24	
<i>ACAD9</i> c.1392 G>T	GG	0,20	0,20	n.s.
	GT	0,54	0,58	
	TT	0,26	0,22	
<i>DGAT1</i> p.K232A	AA	0,92	0,88	n.s.
	AK	0,08	0,10	
	KK	-	0,02	
<i>FASN</i> g.17924 A>G	AA	0,02	-	n.s.
	AG	0,32	0,32	
	GG	0,66	0,68	
<i>PPARGC1A</i> c.1847 C>T	CC	0,98	0,84	**
	CT	0,02	0,16	
	TT	-	-	
<i>PPARGC1A</i> c.1892+19 C>T	CC	0,78	0,80	n.s.
	CT	0,22	0,18	
	TT	-	0,02	
<i>SCD1</i> c.878 C>T	CC	0,16	0,26	n.s.
	CT	0,60	0,62	
	TT	0,24	0,12	
<i>TG</i> c.-537 C>T	CC	0,58	0,60	n.s.
	CT	0,30	0,30	
	TT	0,12	0,10	

<sup>a</sup> n.s. - nicht signifikant; \* P < 0,05; \*\* P < 0,01; \*\*\* P < 0,001

## 4.4 DISKUSSION

Obwohl für die in der vorliegenden Arbeit untersuchten SNPs Assoziationen mit Merkmalen des Fettstoffwechsels in der Literatur beschrieben wurden, konnten bis auf den Austausch c.1847C>T in *PPARGC1A* keine Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen den sich in diesen Merkmalen signifikant unterscheidenden Bullengruppen festgestellt werden. Die Ursachen, weshalb die publizierten Wirkungen der SNPs nicht deutlich wurden, sind vielschichtig. Zum einen spielt die Umwelt eine entscheidende Rolle bei der Merkmalsausprägung. Die Intensität der Mast, ihre Dauer, das eingesetzte Futter sowie die Tierkategorie (Ochse vs. Bulle) beeinflussen die phänotypischen Daten maßgeblich [LEHESKA AND NORTHCUTT 2008, MACNEIL et al. 2008, NOCI et al. 2005, NÜRNBERG UND ENDER 2006]. Beobachtungen, die beispielsweise in amerikanischen oder australischen Rinderpopulationen gemacht wurden, sind somit unter deutschen Mastbedingungen nicht immer reproduzierbar. Weiterhin können Ergebnisse, die in Tieren einer bestimmten Rasse ermittelt wurden, nicht immer auf andere Rassen übertragen werden. Unterschiede in den Allel- und Genotypenfrequenzen machen den Einsatz eines SNPs als Selektionsmarker in einer anderen Rasse oft uneffektiv. Handelt es sich bei einem Polymorphismus nicht um die kausale Mutation, so kann in einer anderen Rasse das Kopplungsungleichgewicht mit der ursächlichen Variation fehlen, wodurch der SNP als Marker unbrauchbar wird.

Die von REICHENEDER et al. [in Vorbereitung] in ***ACAD9*** identifizierten SNPs c.1065G>A und c.1027-130C>T waren in den untersuchten Fleckviehbullen nicht polymorph. Bei den nicht-synonymen Austauschen in Exon 11 (c.1036G>T) und 14 (c.1392G>T) deuteten die Sequenziererergebnisse auf Unterschiede in der Genotypenverteilung in den Bullengruppen hin, was sich nach der Typisierung der 100 Tiere jedoch nicht bestätigte.

REICHENEDER et al. [in Vorbereitung] detektierten die Polymorphismen in *ACAD9* in einem Panel aus zwölf Bullen, je vier Vertreter der Rassen Braunvieh, Fleckvieh und Holstein Friesian. Die Untersuchungen zur Assoziation der SNPs mit *trans*-Fettsäuren in Milch wurde in Kühen der Rasse Holstein Friesian durchgeführt.

Die fehlende Polymorphie der SNPs c.1065G>A und c.1027-130C>T in der vorliegenden Arbeit, sowie die gleiche Verteilung der Genotypen für die Austausche c.1036G>T und c.1392G>T in den beiden Gruppen der Fleckvieh-Bullen lassen vermuten, dass die von REICHENEDER et al. [in Vorbereitung] in Holstein Friesian verifizierten Polymorphismen als

Marker für fettqualitätsrelevante Komponenten im Fleisch von Fleckvieh-Tieren nicht geeignet sind.

Auch bei **DGAT1** ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Bullengruppen. Die nahezu identische *DGAT1*-Genotypenverteilung in den beiden Gruppen ist jedoch nicht gleichbedeutend mit einer fehlenden Assoziation dieses Markers mit den Merkmalen IMF und Marmorierung. Auf Grund der sehr geringen Frequenz ( $<0,06$ ) des bei THALLER et al. [2003a] mit höherem IMF in Verbindung gebrachten K-Allels ist anzunehmen, dass dieser Zusammenhang in den untersuchten Tieren nicht deutlich werden konnte. Es ist möglich, dass bei der Zweinutzungsrasse Fleckvieh indirekt eine Selektion auf das mit höherer Milchmenge assoziierte A-Allel [GRISART et al. 2002, SPELMAN et al. 2002, THALLER et al. 2003b] erfolgte, was gleichbedeutend mit einer niedrigen Frequenz für K wäre. Die in der vorliegenden Arbeit ermittelte geringe Frequenz des K-Allels (0,055) stimmt mit den Angaben für Fleckvieh bei THALLER et al. [2003b] (0,072) und KAUPÉ et al. [2004] (0,06) überein. Zur Verifizierung bzw. Falsifizierung eines Zusammenhangs wäre das Vorkommen einer ausreichenden Anzahl von KK-Genotypen Voraussetzung.

Die Ergebnisse der Sequenzierung des Austausches im **FASN**-Gen ließen ein tendenziell höheres Vorkommen des A-Allels in Bullen mit niedrigen IMF-Zuchtwerten erwarten. Diese Bullengruppe unterschied sich u.a. durch statistisch signifikant niedrigere Ölsäure-(C18:1c9) und MUFA-Anteile von der Gruppe mit den hohen  $EBV_{IMF}$ . Eine höhere Frequenz des A-Allels in der Gruppe mit den niedrigen  $EBV_{IMF}$  würde im Einklang mit der Untersuchung von ZHANG et al. [2008] stehen, die signifikant niedrigere Ölsäure-(C18:1c9) und MUFA-Anteile in Tieren mit dem Genotyp AA im Vergleich zu Artgenossen mit dem Genotyp GG fanden. Die Typisierung des Austausches in den 100 Bullen konnte ein stärkeres Vorkommen des A-Allels in der Gruppe mit den niedrigen  $EBV_{IMF}$  jedoch nicht bestätigen. Es ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied hinsichtlich der Genotypenverteilung in den Bullengruppen. Auch eine Tendenz für das gruppenspezifische Auftreten von Genotypen war nicht feststellbar. Als Ursache für die Diskrepanz zwischen den Ergebnissen bei ZHANG et al. [2008] und denen der vorliegenden Arbeit können die unterschiedlichen Rinderrassen angesehen werden. Im Vergleich zu den bei ZHANG et al. [2008] untersuchten Angus-Bullen zeigten die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Bullen der Rasse Fleckvieh eine äußerst geringe Frequenz für den Genotyp AA (0,36 vs. 0,01). Somit wird der Einfluss des *FASN*-Genotyps AA auf die Merkmalsausprägungen im Fleckvieh nicht deutlich. Die in der Studie von ZHANG et al. [2008] beschriebenen signifikanten Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung ergaben sich hauptsächlich zwischen den homozygoten

Genotypen AA und GG.

Aber auch wenn eine annähernd gleiche Allelfrequenz vorliegen würde, wäre es denkbar, dass die bei ZHANG et al. [2008] beschriebenen Beobachtungen auf Grund der Niveauunterschiede im IMF-Gehalt von Angus- (3,7 % [MACNEIL AND NORTHCUTT 2008]) und Fleckvieh-Bullen (2,5 %, [eigene Daten]) und die allein schon dadurch bedingten Unterschiede in der Fettsäurezusammensetzung im Fleckvieh nicht deutlich werden könnten.

Das sich bei der Sequenzierung des nicht-konservativen SNPs c.1847C>T in **PPARGC1A** angedeutete stärkeres Vorkommen des T-Allels in Bullen aus der Gruppe mit den hohen IMF-Zuchtwerten bestätigte sich bei der Typisierung der 100 Tiere. Die Genotypfrequenzen unterschieden sich signifikant zwischen den beiden Gruppen, wobei der homozygote Genotyp TT jedoch nicht vertreten war. In dem bei WEIKARD et al. [2005] untersuchten Kontroll-Panel aus Deutschen Holstein-Kühen trat der Genotyp TT ebenfalls nicht auf. Die Untersuchung von Assoziationen zwischen diesem Austausch und Milchleistungsmerkmalen (genauer: deren Zuchtwerten) in Deutschen Holstein-Bullen bei WEIKARD et al. [2005] zeigte keinen signifikanten Zusammenhang. Ob der TT-Genotyp in diesen Bullen vertreten war, geht aus der Veröffentlichung nicht hervor. In einer Studie von KOMISAREK AND DORYNEK [2009] zeigten lediglich 4 der untersuchten 453 Polnischen Holstein Friesian-Bullen den Genotyp TT. Signifikante Assoziationen des SNPs c.1847C>T in **PPARGC1A** mit Zuchtwerten für Milchleistungsmerkmale konnten auch hier nicht festgestellt werden.

Die sich in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich des Austausches c.1847C>T in **PPARGC1A** signifikant unterscheidenden Bullengruppen legen die Vermutung nahe, dass dieser SNP die Menge und Zusammensetzung des IMF im *M. long. dorsi* von Fleckvieh-Tieren beeinflussen könnte. Ob und in welchem Ausmaß das T-Allel für einen erhöhten IMF-Gehalt, höhere individuelle Fettsäuremengen und einen geringeren PUFA-Anteil im Muskel verantwortlich ist, sollte in einer Assoziationsstudie mit einer größeren Stichprobe und ggf. unter Einbeziehung weiterer Marker untersucht werden.

Der SNP im Intron 9 von **PPARGC1A** (c.1892+19C>T) zeigte in der vorliegenden Arbeit keine unterschiedliche Genotypenverteilung in den beiden Bullengruppen. Studien von KHATIB et al. [2007] und KOMISAREK AND DORYNEK [2009] in Britischen bzw. Polnischen Holstein-Populationen konnten die von WEIKARD et al. [2005] beschriebene Assoziation des SNPs mit der Fettmenge in Milch nicht bestätigen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich bei dem SNP im Intron 9 des **PPARGC1A**-Gens nicht um die kausale Mutation für den QTL auf BTA6 handelt. Alternativ wäre in Deutschen Holstein

ein Kopplungsungleichgewicht zwischen c.1892+19C>T und dem ursächlichen Austausch denkbar, der nicht in *PPARGC1A* liegen muss, sondern auch in einem benachbarten Gen lokalisiert sein könnte.

In der vorliegenden Arbeit wies nur ein Tier den Genotyp TT auf. Diese Beobachtung steht im Einklang mit den Untersuchungen von WEIKARD et al. [2005], KHATIB et al. [2007] und KOMISAREK AND DORYNEK [2009], aus denen sich ebenfalls Frequenzen < 0,02 für den TT-Genotyp ableiten liessen.

Die Untersuchung des **SCD1**-Polymorphismus c.878T>C ergab eine Häufigkeit des C-Allels von 0,51. Diese in der Zweinutzungsrasse Fleckvieh ermittelte Allelfrequenz liegt in dem bei MILANESI et al. [2008] für Fleischrindrassen beschriebenen Bereich.

Hinsichtlich der Genotypenverteilung in den Bullengruppen wurde in der Gruppe mit den hohen IMF-Zuchtwerten eine tendenziell etwas höhere Frequenz des Genotyps CC festgestellt. Das C-Allel ist bei TANIGUCHI et al. [2004] mit einem höheren MUFA-Anteil im IMF assoziiert. ZHANG et al. [2005] konnten für CT-Tiere im Vergleich zu TT-Tieren einen signifikanten Unterschied hinsichtlich des C16:1/C16:0-Index ermitteln. Die Gruppe mit den hohen EBV<sub>IMF</sub> unterschied sich in diesen Merkmalen signifikant ( $P < 0,001$ ) von der Gruppe mit den niedrigen EBV<sub>IMF</sub>. Dabei zeichneten sich die Tiere in der Gruppe mit den hohen EBV<sub>IMF</sub> durch einen größeren MUFA-Anteil und einen höheren C16:1/C16:0-Quotienten aus.

In der Tendenz entsprach die Verteilung der *SCD1*-Genotypen in den Gruppen den Angaben in der Literatur, ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis rechtfertigt eine Ausweitung der Untersuchung des Austausches im Fleckvieh. Dabei wäre ein anderer Versuchsansatz (Untersuchung einer zufälligen Stichprobe aus der Population) geeigneter, um mögliche Assoziationen mit Merkmalen des Fettstoffwechsels eindeutig zu definieren.

Die ähnliche Genotypenverteilung für den prominenten Marmorierungsmarker **TG** c.-537C>T in den beiden Gruppen stehen im Einklang mit den Ergebnissen der Studien von CASAS et al. [2007], VAN EENENNAAM et al. [2007], GENETIC SOLUTIONS [2008] und RINCKER et al. [2006]. Zwischen TG-Genotyp und Marmorierung bzw. IMF waren auch in diesen Untersuchungen keine signifikanten Zusammenhänge nachweisbar. Bei dem Austausch c.-537C>T scheint es sich somit nicht um die kausale Mutation zu handeln. Die beiden letztgenannten Studien wurden in Fleckvieh durchgeführt und legen die Vermutung nahe, dass die polygenen Merkmale IMF und Marmorierung in dieser Rasse weniger durch TG, sondern vielmehr durch weitere, evtl. noch zu identifizierende Gene beeinflusst werden [MOORE et al. 2003, RINCKER et al. 2006]. Der Einsatz dieses SNPs als

Marker für Marmorierung scheint lediglich in den sich durch stark marmoriertes Fleisch auszeichnenden japanischen Rinderrassen (Wagyu) praktikabel zu sein [CASAS et al. 2007].

Die Untersuchungen ausgewählter SNPs in den Kandidatengenen des bovinen Fettstoffwechsels zeigten, bis auf eine Ausnahme, keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen den divergenten Bullengruppen. Somit scheint, zumindest unter den gegebenen Umweltbedingungen, von den größtenteils in anderen Rassen identifizierten DNA-Variationen beim Fleckvieh keine bedeutende und für den Züchter sinnvoll nutzbare Wirkung auszugehen. Konkrete Aussagen über vorliegende oder fehlende Assoziationen können jedoch erst in Folgeuntersuchungen an einer größeren und zufälligen Stichprobe getroffen werden.

Weiterhin wurde die Notwendigkeit deutlich, die in der Literatur beschriebenen Assoziationen von SNPs mit diversen Merkmalen in der jeweiligen Population zu validieren, bevor diese als Selektionsmarker eingesetzt werden. Wie das Beispiel des Marmorierungs„markers“ *TG* c.-537C>T gezeigt hat, ist die Übertragung einer Assoziation auf andere Rassen nicht immer möglich. Da es sich bei diesem SNP höchstwahrscheinlich nicht um die kausale Mutation handelt, ist die beschriebene Assoziation, außer in Tieren mit Wagyu-Genetik [CASAS et al. 2007], nicht reproduzierbar. Aber auch wenn ein SNP kausal für die Ausprägung eines Merkmals ist, ist ein Einsatz als Marker in Selektionsentscheidungen nicht immer sinnvoll. Obwohl davon auszugehen ist, dass es sich bei *DGAT1* p.K232A um die kausale Mutation für Unterschiede in Milchmenge und -zusammensetzung handelt [GRISART et al. 2004], ist eine Nutzung dieses Markers im Fleckvieh auf Grund der geringen Frequenz des K-Allels nicht effizient möglich.

Aus der vorliegenden Arbeit ergibt sich weiterer Forschungsbedarf auf den Gebieten *PPARGC1A* und *SCD1*. Für den Polymorphismus c.1847C>T in *PPARGC1A* konnte ein signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen den divergenten Bullengruppen festgestellt werden, wobei allerdings nur zwei der erwarteten drei Genotypen auftraten. In weiterführenden Untersuchungen könnte geklärt werden, in wieweit Assoziationen mit den einzelnen Merkmalen des Fettstoffwechsels existieren und ob die bestehenden Allel- und Genotypenfrequenzen einen sinnvollen Einsatz als Selektionsmarker ermöglichen.

Im *SCD1*-Gen zeigte der SNP c.878T>C eine Tendenz zu einer unterschiedlichen Genotypenverteilung. Dieser Trend könnte in einer Folgeuntersuchung evaluiert und die

Eignung des Polymorphismus als Marker eindeutiger bewertet werden.

Weiterhin liefern die Ergebnisse der SNP-Typisierungen in den Fleckvieh-Bullen wertvolle Informationen für rassenübergreifende Vergleiche hinsichtlich der untersuchten DNA-Variationen.

Die in der vorliegenden Arbeit nach dem IMF-Zuchtwert rangierten und als Individuen mit einer genetischen Veranlagung zur Ausprägung von fettstoffwechselrelevanten Merkmalen im Extrembereich identifizierten Bullen stellen ein wertvolles Material für zukünftige grundlegende Forschungsarbeiten auf dem Gebiet des bovinen Fettstoffwechsels dar. Gegenwärtig befinden sich Daten aus einem *variant detector array* in der Auswertung, wofür jeweils 25 unverwandte Tiere mit extrem niedrigen bzw. hohen IMF-Zuchtwerten eingesetzt wurden. Mit Hilfe eines SNP-Chips wurden in den Bullen > 300 weitere in QuaLIPID identifizierte Austausche typisiert. SNPs, die signifikante Unterschiede in der Genotypenverteilung zwischen den beiden Gruppen zeigen und somit Potential für einen zukünftigen Einsatz als Selektionsmarker aufweisen, sollen anschließend in einer Assoziationsstudie mit zufällig ausgewählten Fleckvieh-Bullen validiert werden.



## 5 ABSCHLUSSBETRACHTUNG

Die Nutzung genetischer Informationen als Selektionskriterien in der Tierzucht gewinnt immer stärker an Bedeutung [DGFZ 2004, LFL 2008]. Das Ziel des FUGATO-Projekt *QuaLIPID* war die Identifizierung von fettqualitätsrelevanten SNPs, die sich als potentielle genetische Marker im Bereich Produktqualität eignen. Die Ausprägung des Fettgehaltes und der Fettsäurezusammensetzung im Fleisch hat zwar auch eine genetische Komponente, zu einem großen Teil werden diese Merkmale jedoch durch die Fütterung beeinflusst [DE SMET et al. 2004, GIVENS et al. 2006, SCOLLAN et al. 2006]. So ist beim Rind eine signifikante Erhöhung der n-3 Fettsäuren im Muskel durch die Fütterung von Gras bzw. Grassilage im Vergleich zu Getreide-basierter Konzentratfütterung möglich [DANNENBERGER et al. 2004, SCOLLAN et al. 2006, WARREN et al. 2008]. In der Schweinefütterung hat sich der Einsatz von Leinsamen als Quelle der für den Menschen essentiellen n-3 Fettsäuren bewährt [ENSER et al. 2000, KOUBA et al. 2003]. Beim Schwein ist eine Beeinflussung des Fettgehaltes und der Fettsäurezusammensetzung über die Fütterung auch ohne die Gabe einer bestimmten Fettsäurequelle möglich. Die Verabreichung einer proteinarmen Ration limitiert den Muskelaufbau. Überschüssige Energie wird über die Fettsynthese kompensiert, was zu erhöhten Fettgehalten im Muskel führt [DA COSTA et al. 2004, DORAN et al. 2006, WOOD et al. 2004]. Die Fettsäurezusammensetzung variiert mit dem Fettgehalt, wobei ein niedriger IMF mit einem höheren PUFA-Anteil einher geht [WOOD et al. 2008]. Generell ist die Beeinflussung der Fettsäurezusammensetzung im Muskel am effizientesten über die Modulation des Gesamtfettgehaltes möglich [DE SMET et al. 2004].

Nutritive Einflüsse wurden in der vorliegenden Arbeit konstant gehalten, um den Einfluss der Genetik untersuchen zu können. Für die Ausprägung fettstoffwechselbezogener Merkmale ist die Fütterung jedoch von großer Bedeutung. Genetische Variationen, die Assoziationen mit Merkmalen des Fettstoffwechsels zeigen, sollten aus diesem Grund vor einer praktischen Anwendung als Selektionsmarker bei verschiedenen Rationsgestaltungen validiert werden.

Unabhängig davon, ob die ernährungsphysiologisch günstigere Fettsäurezusammensetzung im Fleisch durch Selektionsmaßnahmen oder über die Fütterung erreicht wird, werden neben den nutritiven Kriterien auch die technologischen Eigenschaften des

Fleisches verändert. Ein höherer Anteil an essentiellen, mehrfach ungesättigten Fettsäuren erzeugt Fett mit niedrigerem Schmelzpunkt, was die Verarbeitung von Fleisch und Speck beeinflusst [NÜRNBERG AND ENDER 2006, WOOD et al. 2008]. Das weichere Fett führt zu Schwierigkeiten beim Zerlegen und macht die Herstellung von Wurstwaren problematisch [GÖTZ et al. 2001, WARNANTS et al. 1998]. Außerdem ist Fleisch mit einem erhöhten Anteil an mehrfach ungesättigter Fettsäuren und daraus hergestellte Produkte anfälliger für Oxidation, was in einer geringeren Haltbarkeit resultiert [WOOD et al. 2008].

In der Literatur gibt es Hinweise, dass erhöhte Gehalte mehrfach ungesättigter Fettsäuren den Geruch und Geschmack von Fleisch negativ beeinflussen können [KOUBA et al. 2003, SCOLLAN et al. 2006, WOOD et al. 2008]. Ob diese Fehlaromen ausschliesslich mit der Verabreichung spezieller Futtermittel (Leinsamen, Fischöl) einhergehen oder auch in Fleisch von Tieren zu erwarten sind, deren Fettsäurezusammensetzung mit Hilfe züchterischer Massnahmen moduliert wurde, konnte bisher noch nicht geklärt werden.

Diese Auswirkungen auf die technologische und organoleptische Qualität müssen bei der Erzeugung von Fleisch mit einer ernährungsphysiologisch günstigeren Fettsäurezusammensetzung beachtet werden.

## 6 ZUSAMMENFASSUNG / SUMMARY

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des FUGATO-Verbundprojektes QuaLIPID angefertigt. Im Fokus von QuaLIPID stand die funktionelle Untersuchung von Genen, die im Fettstoffwechsel der Spezies Rind und Schwein eine bedeutende Rolle spielen. Ziel des Projektes war die Identifizierung von DNA-Varianten, welche die Qualität tierischer Produkte maßgeblich beeinflussen.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Realisierung des Projektzieles war die Erhebung möglichst zahlreicher Lipidparameter. Da die Gaschromatographie als Standardverfahren in der Fettsäureanalytik sehr zeitaufwändig ist, sollte in der vorliegenden Arbeit ein auf Nahinfrarotspektroskopie (NIRS) basierendes Verfahren zur Bestimmung von Fettsäureparametern in Rind- und Schweinefleisch entwickelt werden. Im Gegensatz zur Gaschromatographie zeichnet sich die Nahinfrarotspektroskopie durch Schnelligkeit, einen geringen Aufwand bei der Probenvorbereitung und den Verzicht auf Chemikalien aus. Voraussetzung für den routinemäßigen Einsatz dieser innovativen Technik ist die Erstellung von Kalibrierungen für die zu analysierenden Parameter. Zu diesem Zweck wurden in der vorliegenden Arbeit NIR-Spektren und Referenzdaten von 132 Rind- und 149 Schweinefleischproben (*M. long. dors*) erfasst. Sowohl die simultane Bearbeitung der Spezies Rind und Schwein als auch die Gegenüberstellung von Kalibrierungen für relative (%) und absolute (mg FS/100 g Muskel) Fettsäureparameter ist bis dato einzigartig.

Die besten Kalibrierungen ergaben sich i.d.R. für Summenparameter. Die Vorhersage von Einzelfettsäuren gelang jedoch auch mit z.T. sehr guten Resultaten. Der Vergleich von Kalibrierungen für relative und absolute Fettsäuredaten zeigte deutliche Unterschiede in der Kalibrationsgüte in Abhängigkeit vom Sättigungsgrad der Parameter. Absolute Gehalte gesättigter und einfach ungesättigter Einzelfettsäuren sowie deren Summen konnten sowohl in Rind-, wie auch in Schweinefleisch mit sehr guter Genauigkeit bestimmt werden ( $RSQ_{cal}$ : 0,85 - 0,99; RPD: 2 - 10). Die besten Kalibrierungen ergaben sich dabei für die Summenparameter SFA und MUFA. In Rindfleisch erreichten diese Parameter  $RSQ_{cal} > 0,99$  und  $RPDs > 8$ . In Schweinefleisch konnten  $RSQ_{cal} > 0,97$  und  $RPDs > 4$  erzielt werden. Eine routinemäßige Bestimmung mehrfach ungesättigter Verbindungen mit NIRS war hingegen nicht möglich. Für die Untersuchungen innerhalb

von *QuaLIPID* konnte jedoch der Einsatz diverser Kalibrierungen für einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren erfolgen.

Ein umgekehrtes Bild ergab sich bei den Kalibrierungen, die auf relativen Daten beruhten. Hier konnten hauptsächlich für Parameter mit mehr als einer Doppelbindung einsetzbare Kalibrierungen entwickelt werden. Die Bestimmung mit NIRS war bei gesättigten und einfach ungesättigten Parameter sowohl in Rind-, wie auch in Schweinefleisch nicht bzw. nur schlecht möglich.

Die Gegenüberstellung der Kalibrierungen in Rind- und Schweinefleisch zeigte sowohl bei relativen als auch absoluten Parametern ausnahmslos bessere Kalibrationsstatistiken für die Parameter in Rindfleisch. Dieser Unterschied wurde auf die höhere Variabilität in den Datensätzen vom Rind zurückgeführt.

Mit den in dieser Arbeit entwickelten Kalibrierungen wurden 2.110 NIR-Spektren von Rind- und 11.070 Spektren von Schweinefleischproben ausgewertet. Diese Daten bildeten die Grundlage für die Identifizierung von Individuen mit extremer genetischer Veranlagung für Untersuchungen zur Assoziation von DNA-Varianten mit Merkmalen des Fettstoffwechsels. Die Auswahl der Tiere sollte anhand von Zuchtwerten erfolgen. Zu diesem Zweck wurden, basierend auf den NIRS-Daten, Varianzkomponenten und genetische Parameter (Heritabilitäten, genetische und phänotypische Korrelationen) geschätzt.

Es ergaben sich moderate bis hohe Heritabilitäten, die in beiden Spezies eine Beeinflussbarkeit der fettstoffwechselbezogenen Merkmale durch die Zucht erwarten ließen. Beim Rind zeigten sich sehr hohe genetische Korrelationen zwischen den einzelnen Fettsäureparametern und dem IMF, weshalb entschieden wurde, die Auswahl der Tiere für die genetischen Untersuchungen nach ihren Zuchtwerten für das Merkmal IMF durchzuführen. Auf diese Weise konnten zwei Gruppen zu je 50 Bullen gebildet werden, die sich hinsichtlich fettstoffwechselbezogener Merkmale signifikant von einander unterschieden.

In der Spezies Schwein oblag die Untersuchung der Zusammenhänge von Lipidparametern und identifizierter DNA-Variation dem Projektpartner TUM (Technische Universität München, Lehrstuhl für Tierzucht). Zuchtwerte wurden nach Rücksprache mit dem Partner TUM für ausgewählte Parameter geschätzt und zusammen mit den individuellen Identifikationsnummern für die Anforderung der DNA zur Verfügung gestellt.

Die Untersuchung von DNA-Varianten in den Kandidatengenen *ACAD9*, *DGAT1*, *FASN*, *PPARGC1A*, *SCD1* und *TG* ergab, bis auf eine Ausnahme, keinen signifikanten

Unterschied in der Genotypenverteilung zwischen den Bullengruppen. Für den SNP c.1847C>T in *PPARGC1A* konnte ein signifikanter Unterschied in der Genotypenverteilung festgestellt werden, wobei heterozygote Tiere bevorzugt in der Gruppe mit den hohen IMF-Zuchtwerten auftraten. Tiere mit dem Genotyp TT kamen in dieser Arbeit nicht vor. Der Polymorphismus c.878T>C im *SCD1*-Gen zeigte in der Tendenz eine unterschiedliche Genotypenverteilung in den beiden Gruppen, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Für das C-Allel homozygote Bullen waren stärker in der Gruppe mit den hohen IMF-Zuchtwerten vertreten, während TT-Tiere vermehrt in der Gruppe mit den niedrigen IMF-Zuchtwerten vorkamen.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die in der Praxis genutzten Gentests *TG* c.-537C>T und *DGAT1* p.K232A bei Fleckvieh auf Grund einer fehlenden Assoziation bzw. einer ungünstigen Allelfrequenz nicht zielführend sind.

---

The present thesis was accomplished within the FUGATO-project QuaLIPID. The emphasis of QuaLIPID was the functional analysis of genes playing an important role in lipid metabolism of cattle and pig. The aim of the project was to identify DNA variants that strongly affect the quality of animal products.

An important requirement for the realisation of the project's aim was the analysis of a large number of lipid parameters. The reference method in fatty acid analysis, gas chromatography, is very time-consuming. An intention of this work was to develop a method based on near-infrared spectroscopy for the determination of fatty acid parameters in beef and pork. In contrast to gas chromatography, near-infrared spectroscopy is characterized by its speed, little sample preparation effort and the lack of chemicals. The routine use of this innovative technique requires the development of calibrations for the parameters of interest. For this purpose NIR spectra and chemical reference values of 132 beef samples and 149 pork samples (*M. long. dorsi*) were collected. Both, the simultaneous processing of cattle and pig and the comparison of calibrations for relative (%) and absolute (mg FA/100 g muscle) amounts of fatty acids is unique to date.

Generally, the best calibrations arised for sum parameters. To some extent the prediction of individual fatty acids gave very good results as well. Comparison of calibrations for relative and absolute fatty acid data revealed differences in calibration performance depending on the degree of saturation. Absolute amounts of saturated and

monounsaturated single fatty acids and their sums could be determined with very good accuracy in beef as well as in pork ( $RSQ_{cal}$ : 0,85 - 0,99; RPD: 2 - 10). The best calibrations resulted for the sum parameters SFA and MUFA. In beef this parameters reached  $RSQ_{cal} > 0,99$  and RPDs  $> 8$ . In pork  $RSQ_{cal} > 0,97$  and RPDs  $> 4$  could be achieved. A routinely determination of polyunsaturated compounds with NIRS was not possible. Nevertheless, for the studies within *QuaLIPID* the quality of individual calibrations for polyunsaturated fatty acids was sufficient.

A reverse situation resulted for calibrations based on relative data. Usable calibrations could be developed mainly for parameters with more than one double bond. The determination of saturated and monounsaturated parameters with NIRS was not, or only poorly possible in beef as well as in pork.

Comparison of calibrations between beef and pork revealed better calibration statistics for both relative and absolute parameters in beef. This difference was thought to be due to the higher variability of the cattle data.

The established calibrations were used to analyse 2.110 NIR spectra of beef and 11.070 spectra of pork samples. Those data were the basis for the identification of individuals with an extreme genetic background for association analysis of DNA variation and lipid metabolism related traits. Selection of animals was planned to be carried out using breeding values. For this purpose variance components and genetic parameters (heritabilities, genetic and phenotypic correlations) based on NIRS data were estimated.

In both species, heritabilities were moderate to high, indicating that lipid metabolism related traits could be influenced by breeding. In cattle, individual fatty acid parameters were genetically very high correlated with IMF. Thus, for the genetic studies animals were selected solely according to their breeding values for the trait IMF. Thus, two groups could be selected, each comprising 50 bulls. As expected, the groups differed significantly in lipid metabolism related traits.

In pig, association studies of identified DNA variation with lipid parameters should be performed by the project partner TUM (Technische Universität München, Lehrstuhl für Tierzucht). After consultation with the partner TUM breeding values were estimated for selected parameters. Breeding values, along with individual identification numbers for the request of DNA, were provided.

The study of DNA variation in candidate genes *ACAD9*, *DGAT1*, *FASN*, *PPARGC1A*, *SCD1* and *TG* revealed no significant differences in the distribution of genotypes between the groups of bulls, with one exception. For SNP c.1847C>T in *PPARGC1A* a significant

difference could be observed. Heterozygous animals emerged preferably in the group with the high IMF breeding values. The genotype TT did not occur in the animals studied. The genotypes for polymorphism c.878T>C in the gene encoding *SCD1* tended to be distributed differently in the two groups, but the result was not statistical significant. Bulls being homozygous for the allele C were represented strongly in the group that was characterized by high IMF breeding values, whereas there was an increased appearance of TT animals in the group with the low IMF breeding values.

Furthermore, it could be shown that an application of the genetic tests *TG* c.-537C>T and *DGAT1* p.K232A is not reasonably useful in German Simmental due to a missing association and an unfavourable allele frequency, respectively.

---

## LITERATURVERZEICHNIS

- Aass L: Variation in carcass and meat quality traits and their relations to growth in dual purpose cattle. *Livest Prod Sci* 1996;46:1-12
- Aldai N, Osoro K, Barrón LJR, Nájera AI: Gas-liquid chromatographic method for analysing complex mixtures of fatty acids including conjugated linoleic acids (*cis9trans11* and *trans10cis12* isomers) and long-chain (n-3 or n-6) polyunsaturated fatty acids. Application to the intramuscular fat of beef meat. *J Chromat A*, 2006;1110:133-139
- Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, Ron M, Weller JL, Lewin HA: Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *J Dairy Sci* 2004;87(2):468-475
- Barendse W: Assessing lipid metabolism. Patents WO9923248 US6383751 (PCT/AU98/00882), 1997
- Barendse W, Bunch R, Thomas M, Armitage S, Baud S, Donaldson N: The TG5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust J Exp Agr* 2004;44:669-674
- Barlocco N, Vadell A, Ballesteros F, Galietta G, Cozzolino D: Predicting intramuscular fat, moisture and Warner-Bratzler shear force in pork muscle using near infrared reflectance spectroscopy. *Animal Science* 2006;82(1):111-116
- Bennewitz J, Reinsch N, Grohs C, Leveziel H, Malafosse A, Thomsen H, Xu N, Looft C, Kühn C, Brockmann GA, Schwerin M, Weimann C, Hiendleder S, Erhardt G, Medjugorac I, Russ I, Förster M, Brenig B, Reinhardt F, Reets R, Averdunk G, Blümel J, Boichard D, Kalm E: Combined analysis of data from two granddaughter designs: A simple strategy for QTL confirmation and increasing experimental power in dairy cattle. *GSE* 2003;3(35):319-338
- Bennewitz J, Reinsch N, Paul S, Looft C, Kaupe B, Weimann C, Erhardt G, Thaller G, Kühn C, Schwerin M, Thomsen H, Reinhardt F, Reents R, Kalm E: The DGAT1 K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. *J Dairy Sci* 2004;2(87):431-442
- BMELV: Verordnung zum Schutz von Tieren im Zusammenhang mit der Schlachtung oder Tötung (Tierschutz-Schlachtverordnung - TierSchlV). Verordnung des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten v. 03.03.1997 (BGBl. I S. 405), zuletzt geändert durch Art. 19 des Gesetzes v. 13.04.2006 (BGBl. I S. 855, 859)
- Boichard D, Grohs C, Bourgeois F, Cerqueira F, Faugeras R, Neau A, Rupp R, Amigues Y, Boscher MY, Leveziel H: Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *GSE* 2003;1(35):77-101
- Bokobza L: Near infrared spectroscopy. *J Near Infrared Spectrosc* 1998;6:3-17
- BStMLF: Leistungsprüfungen und Zuchtwertfeststellung bei Rindern. In: BStMLF: Richtlinien zum Vollzug tierzuchtrechtlicher Vorschriften (TierZR). Bekanntmachung des Bayerischen Staatsministeriums für Landwirtschaft und Forsten v. 01.10.2003 (AllMBI S. 585, ber. S. 926)
- Buitkamp J, Antes R, Wagner V : DNA profiling in veterinary medicine. In: Epplen JT and Lubjuhn T (Eds.): DNA profiling and DNA fingerprinting. Birkhäuser Verlag, Basel, Schweiz, 1999;53-70
- Bünig-Pfaue H: Analysis of water in food by near infrared spectroscopy. *Food Chemistry* 2003;82:107-115



- Cameron ND, Enser MB: Fatty acid composition of lipid in longissimus dorsi muscle of Duroc and British Landrace pigs and its relationship with eating quality. *Meat Science* 1991;29:295-307
- Campbell EMG, Gallagher DS, Davis SK, Taylor JF, Smith SB: Rapid communication: Mapping of the bovine stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) gene to BTA26. *J Anim Sci* 2001;79:1954-1955
- Casas E, White SN, Shackelford SD, Wheeler TL, Koohmaraie M, Bennett GL, Smith TP: Assessing the association of single nucleotide polymorphisms at the thyroglobulin gene with carcass traits in beef cattle. *J Anim Sci* 2007;85:2807-2814
- Cases S, Smith SJ, Zheng YW, Myers HM, Lear SR, Sande E, Novak S, Collins C, Welch CB, Lusis AJ, Erickson SK, Farese RV: Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:13018-13023
- Catapult Genetics: GeneNOTE 12: GeneSTAR Marbling 4 - a multi marker DNA test for marbling. [http://www.geneticsolutions.com.au/files/pdf/GeneNOTE\\_12\\_M4.pdf](http://www.geneticsolutions.com.au/files/pdf/GeneNOTE_12_M4.pdf) (13.09.2008), PDF-Dokument, 3 S
- Christie WW (Ed.): Lipid analysis. Isolation, separation, identification and structural analysis of lipids. The Oily Press/ PJ Barnes, Bridgwater, England, 3<sup>rd</sup> Ed., 2003
- Christie WW: Preparation of lipid extracts from tissues. In: Christie WW (Ed.): Advances in lipid methodology - two. The Oily Press, Dundee, Scotland, 1993;195-213
- Christie WW (Ed.): Gas chromatography and lipids. A practical guide. The Oily Press, Bridgwater, England, 1989
- Corl BA, Baumgard LH, Dwyer DA, Griinari JM, Phillips BS, Bauman DE: The role of Delta(9)-desaturase in the production of cis-9, trans-11 CLA. *J Nutr Biochem* 2001;12(11):622-630
- da Costa N, McGillivray C, Bai Q, Wood JD, Evans G, Chang KC: Restriction of dietary energy and protein induces molecular changes in young porcine skeletal muscles. *J Nutr* 2004;134(9):2191-2199
- Dannenberger D, Nürnberg G, Scollan N, Schabbel W, Steinhart H, Ender K, Nürnberg K: Effect of diet on the deposition of n-3 fatty acids, conjugated linoleic and C18:1 trans fatty acid isomers in muscle lipids of German Holstein bulls. *J Agric Food Chem* 2004;52:6607-6615
- Davies AMC: An introduction to near infrared spectroscopy. *NIR news* 2005;16(7):9-11
- Davies AMC, Fearn T: Back to basics: calibration statistics. *Spectroscopy Europe* 2006;18(2):31-32
- Dempfle L: Zuchtwertschätzung. In: Kräusslich H (Hrsg.): Tierzüchtungslehre. Ulmer, Stuttgart, 4. Auflage, 1994;281-304
- De Smet S, Raes K, Demeyer D: Meat fatty acid composition as affected by fatness and genetic factors: a review. *Anim Res* 2004;53:81-98
- DFAL (Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie) (Hrsg.): Souci - Fachmann - Kraut: Die Zusammensetzung der Lebensmittel - Nährwert-Tabellen. MedPharm Scientific Publishers, Stuttgart, 7. Auflage, 2008
- DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung) (Hrsg.): Evidenzbasierte Leitlinie: Fettkonsum und Prävention ausgewählter ernährungsmitbedingter Krankheiten. DGE, Bonn, 2006. online verfügbar unter <http://www.dge.de/leitlinie/> (02.04.2008), PDF-Dokument, 326 S
- DGE (Deutsche Gesellschaft für Ernährung), ÖGE (Österreichische Gesellschaft für Ernährung), SGE (Schweizerische Gesellschaft für Ernährungsforschung), SVE

- (Schweizerische Vereinigung für Ernährung) (Hrsg.): D-A-CH Referenzwerte für die Nährstoffzufuhr. Umschau/ Braus, Frankfurt am Main, 1. Auflage, 2000
- DGF - Deutsche Gesellschaft für Fettwissenschaften e. V. (Hrsg.): Methode C-VI 11e (98) Fettsäuremethylester (TMSH-Methode). DGF-Einheitsmethoden. Deutsche Einheitsmethoden zur Untersuchung von Fetten, Fettprodukten, Tensiden und verwandten Stoffen. Wiss. Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 2. Auflage einschl. 12. Aktualisierungslieferung, 2007
- DGfZ - Deutsche Gesellschaft für Züchtungskunde: Perspektiven der Tierzüchtungswissenschaft. Stellungnahme der DGfZ-Projektgruppe 'Weiterentwicklung züchterischer Methoden und Verfahren'. *Züchtungskunde* 2004;4:231-234
- Doran O, Moule SK, Teye GA, Whittington FM, Hallett KG, Wood JD: A reduced protein diet induces stearoyl-CoA desaturase protein expression in pig muscle but not in subcutaneous adipose tissue: relationship with intramuscular lipid formation. *Br J Nutr* 2006;95:609-617
- Dugan MER, Aalhus JL, Kramer JKG: Conjugated linoleic acid pork research. *Am J Clin Nutr* 2004;79(suppl):1212S-1216S
- Eaton S, Bartlett K, Pourfarzam M: Mammalian mitochondrial  $\beta$ -oxidation. *Biochem J* 1996;320:345-357
- Ensenauer R, He M, Willard JM, Goetzman ES, Corydon TJ, Vandahl BB, Mohsen AW, Isaya G, Vockley J: Human acyl-CoA dehydrogenase plays a novel role in the mitochondrial  $\beta$ -oxidation of unsaturated fatty acids. *J Biol Chem* 2005;280(37):32309-32316
- Enser M, Hallett KG, Hewett B, Fursey GAJ, Wood JD, Harrington G: Fatty acid content and composition of UK beef and lamb muscle in relation to production system and implications for human nutrition. *Meat Sci* 1998;49(3):329-341
- Enser M, Richardson RI, Wood JD, Gill BP, Sheard PR: Feeding linseed to increase the n-3 PUFA of pork: fatty acid composition of muscle, adipose tissue, liver and sausages. *Meat Sci* 2000;55:201-212
- Falconer DS (Hrsg.): Einführung in die quantitative Genetik. Ulmer, Stuttgart, 1984
- Finck BN, Kelly DP: PGC-1 coactivators: inducible regulators of energy metabolism in health and disease. *J Clin Invest* 2006;116(3):615-622
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH: A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem* 1957;226:497-509
- FOSS Analytical A/S: Instrument Performance Test Guide. FOSS manual 60012783, Hillerød, Denmark, Rev. 2.0, 2005
- FOSS, Infrasoft International (ISI) (2005): A brief introduction to NIR spectroscopy. [www.winisi.com/NIRS\\_theory.htm](http://www.winisi.com/NIRS_theory.htm) (04.10.2006)
- FOSS GmbH: WinISI Schulungsunterlagen. Rellingen, Stand Feb 2007
- Freyer G, Sorensen P, Kühn C, Weikard R, Hoeschele I: Search for pleiotropic QTL on chromosome BTA6 affecting yield traits of milk production. *J Dairy Sci* 2003;86:999-1008
- Fries R: QuaLIPID - Functional analysis of genes involved in lipid metabolism in cattle and swine for the identification of product quality relevant DNA variation. A FUGATO project proposal. projektinterne Kommunikation, 2005
- Fürst C, Dodenhoff J, Emmerling R, Krogmeier D, Niebel E: Zuchtwertschätzung beim Rind. Grundlagen, Methoden und Modelle. ZuchtData (Hrsg.), Wien, 2009
- Gautier M, Capitan A, Fritz S, Eggen A, Boichard D, Druett T: Characterization of the

- DGAT1 K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. *J Dairy Sci* 2007;90:2980-2988
- Genetic Solutions (2001): GeneNOTE 1. [http://www.geneticsolutions.com.au/files/GeneSTAR/pdf/GeneNOTE\\_1.pdf](http://www.geneticsolutions.com.au/files/GeneSTAR/pdf/GeneNOTE_1.pdf) (27.05.2008), PDF-Dokument, 2 S
- Genetic Solutions: GeneNOTE 5. Independent US study confirms GeneSTAR marbling effects on marbling score and quality grade. [http://www.geneticsolutions.com.au/files/GeneSTAR/pdf/GeneNOTE\\_5.pdf](http://www.geneticsolutions.com.au/files/GeneSTAR/pdf/GeneNOTE_5.pdf) (27.05.2008), PDF-Dokument, 2 S
- Givens DI, Kliem KE, Gibbs RA: The role of meat as a source of n-3 polyunsaturated fatty acids in the human diet. *Meat Sci* 2006;74:209-218
- Gläser KR, Scheeder MRL, Wenk C: Dietary C18:1 *trans* fatty acids increase conjugated linoleic acid in adipose tissue of pigs. *Eur J Lipid Sci Technol* 2000;102:684-686
- Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ: Finding genes that underlie complex traits. *Science* 2002;298:2345-2349
- Götz KU, Peschke W, Schuster M: Genetische Parameter für intramuskuläres Fett und Merkmale der Fettqualität gemessen mit Nah-Infrarot-Reflexions-Spektrometrie an Schweinen aus bayerischen Leistungsprüfungsstationen. *Züchtungskunde* 2001;73(3):233-242
- Gonzalez-Martin I, Gonzalez-Perez C, Hernandez-Mendez J, Alvarez-Garcia N, Hernandez Andaluz JL: On-line non-destructive determination of proteins and infiltrated fat in Iberian pork loin by near infrared spectrometry with a remote reflectance fibre optic probe. *Analytica Chimica Acta* 2002;453:281-288
- Gonzalez-Martin I, Gonzalez-Perez C, Alvarez-Garcia N, Gonzalez-Cabrera JM: On-line determination of fatty acid composition in intramuscular fat of Iberian pork loin by NIRs with a remote reflectance fiber optic probe. *Meat Science* 2005;69:243-248
- Grisart B, Coppieters W, Farnir F, Karim L, Ford C, Berzi P, Cambisano N, Mni M, Reid S, Simon P, Spelman R, Georges M, Snell R: Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res* 2002;12(2):222-231
- Grisart B, Farnir F, Karim L, Cambisano N, Kim JJ, Kvasz A, Mni M, Simon P, Frere JM, Coppieters W, Georges M: Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(8):2398-2403
- Groeneveld E, Kovac M, Wang T: PEST. Multivariate prediction and estimation. Department of Animal Sciences, University of Illinois, USA, 1990
- Gurr MI (Ed.): Lipids in nutrition and health: a reappraisal. The Oily Press/ PJ Barnes, Bridgwater, England, 1999
- Harder B, Bennewitz J, Reinsch N, Thaller G, Thomsen H, Kühn C, Schwerin M, Erhardt G, Förster M, Reinhardt F, Kalm E: Mapping of quantitative trait loci for lactation persistency traits in German Holstein dairy cattle. *J Anim Breed Genet* 2006;123(2):89-96
- Henderson CR: Sire evaluation and genetic trends. *Proceedings of the animal breeding symposium in honor of Dr JL Lush* 1973:10-41
- Heyen DW, Weller JL, Ron M, Band M, Beever JE, Feldmesser E, Da Y, Wiggans GR, VanRaden PM, Lewin HA: A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol Genomics* 1999;1(3):165-175
- Hruschka WR: Data analysis: wavelength selection methods. In: Williams PC, Norris KH (Eds.): Near infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004;39-58

- Hulshof KFAM, van Erp-Baart MA, Anttolainen M, Becker W, Church SM, Couet C, Hermann-Kunz E, Kesteloot H, Leth T, Martins I, Moreiras O, Moschandreas J, Pizzoferrato L, Rimestad AH, Thorgeirsdottir H, van Amelsvoort JMM, Aro A, Kafatos AG, Lanzmann-Petithory D, van Poppel G: Intake of fatty acids in Western Europe with emphasis on *trans* fatty acids: the TRANSFAIR study. *Eur J Clin Nutr* 1999 ;53 :143-157
- ISI (Infrasoft International): WinISI II - Version 1.02A: The complete software solution for routine analysis, robust calibrations, and networking. Manual. Infrasoft International LLC, Port Matilda, USA, 1999
- Kaupe B, Winter A, Fries R, Erhardt G: DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *J Dairy Res* 2004;71:182-187
- Kaupe B, Brandt H, Prinzenberg EM, Erhardt G: Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction and productive lifespan in German Holstein cattle. *J Anim Sci* 2007;85:11-21
- Kgwatalala PM, Ibeagha-Awemu EM, Hayes JF, Zhao X: Single nucleotide polymorphisms in the open reading frame of the stearoyl-CoA desaturase gene and resulting genetic variants in Canadian Holstein and Jersey cows. *DNA Sequence* 2007;18(5):357-362
- Khatib H, Zaitoun I, Wiebelhaus-Finger J, Chang YM, Rosa GJM: The association of bovine PPARGC1A and OPN genes with milk composition in two independent Holstein cattle populations. *J Dairy Sci* 2007, 90:2966-2970
- Knight T, Minick J, Tait R, Trenkle A, Wilson D, Rouse G, Strohbehn D, Reecy J, Beitz D: Redesigning beef cattle to have a more healthful fatty acid composition. *Iowa State University Animal Industry Report* 2004, ASL-R1882
- Komisarek J, Dorynek Z: Effect of ABDG2, PPARGC1A, OLR1 and SCD1 gene polymorphism on estimated breeding values for functional and production traits in Polish Holstein-Friesian bulls. *J Appl Genet* 2009;50(2):125-132
- Kouba M, Enser M, Whittington FM, Nute GR, Wood JD: Effect of a high-linolenic acid diet on lipogenic enzyme activities, fatty acid composition, and meat quality in the growing pig. *J Anim Sci* 2003;81:1967-1979
- Kramer JKG, Cruz-Hernandez C, Zhou J: Conjugated linoleic acids and octadecenoic acids: Analysis by GC. *Eur J Lipid Sci Technol* 2001;103 :594-632
- Kühn C, Freyer G, Weikard R, Goldammer T, Schwerin M: Detection of QTL for milk production traits in cattle by application of a specifically developed marker map of BTA6. *Anim Genet* 1999;30:333-340
- Kühn C, Thaller G, Winter A, Bininda-Emonds ORP, Kaupe B, Erhardt G, Bennewitz J, Schwerin M, Fries R: Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics* 2004;167(4):1873-1881
- Leheska JM, Thompson LD, Howe JC, Hentges E, Boyce J, Brooks JC, Shriver B, Hoover L, Miller MF: Effects of conventional and grass-feeding systems on the nutrient composition of beef. *J Anim Sci* 2008;86:3575-3585
- Le Hir H, Nott A, Moore MJ: How introns influence and enhance eukaryotic gene expression. *Trends Biochem Sci* 2003;28:215-220
- LFGB: Bestimmung des Gesamtfettgehaltes in Fleisch und Fleischerzeugnissen L 06.00-6. § 64 Amtliche Sammlung von Untersuchungsverfahren. Lebensmittel- und Futtermittelgesetzbuch. Neugefasst durch Bek. v. 26.04.2006 (BGBl. I S. 945), zuletzt geändert durch Art. 12 des Gesetzes v. 26.02.2008 (BGBl. I S. 215)

- LfL - Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft (Hrsg.): Neue Methoden in der Rinderzucht. Fachtagung des Kompetenzzentrums für innovative Tierzucht. Tagungsband. *LfL Schriftenreihe* 2008
- Li H, van de Voort FR, Sedman J, Ismail AA: Rapid determination of *cis* and *trans* content, iodine value, and saponification number of edible oils by Fourier transform near-infrared spectroscopy. *JAOCs* 1999;76(4):491-497
- Lin J, Handschin C, Spiegelman BM: Metabolic control through the PGC-1 family of transcription coactivators. *Cell Metab* 2005;1(6):361-370
- Lowell BB: PPAR $\gamma$ : an essential regulator of adipogenesis and modulator of fat cell function. *Cell* 1999;99:239-242
- MacNeil MD, Northcutt SL: National cattle evaluation system for combined analysis of carcass characteristics and indicator traits recorded by using ultrasound in Angus cattle. *J Anim Sci* 2008;86:2518-2524
- Madsen P, Jensen J: A user's guide to DMU - a package for analysing multivariate mixed models. Version 6, DJF, Research Centre Foulum, Tjele, Dänemark, 2000
- Marshall DM: Genetics of meat quality. In: Fries R, Ruvinsky A (Eds.): The genetics of cattle. CABI Publishing, Wallingford, UK, 1999; 605-636
- Melton SL, Amiri M, Davis GW, Backus WR: Flavor and chemical characteristics of ground beef from grass-, forage-grain- and grain-finished steers. *J Anim Sci* 1982;55:77-87
- Microsoft: Microsoft Office 2000. Microsoft Excel. Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA, 2000
- Milanesi E, Nicoloso L, Crepaldi P: Stearoyl CoA desaturase (SCD) gene polymorphisms in Italian cattle breeds. *J Anim Breed Genet* 2008;125:63-67
- Miller CE: Chemical principles of near-infrared technology. In: Williams PC, Norris KH (Eds.): Near infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004;19-37
- Mitsuhashi T: Application of genetic information to high quality beef production. [http://www.prescribe-genomics.com/english/article\\_1.html](http://www.prescribe-genomics.com/english/article_1.html); 27.05.2008; 4 S
- Morris CA, Cullen NG, Glass BC, Hyndman DL, Manley TR, Hickey SM, McEvan JC, Pitchford WS, Bottema CDK, Lee MAH: Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mamm Genome* 2007;18:64-74
- MRI - Max Rubner-Institut, Bundesforschungsinstitut für Ernährung und Lebensmittel (Hrsg.): Nationale Verzehrsstudie II - Ergebnisbericht, Teil 2. Max Rubner-Institut, Karlsruhe, 2008
- Murray I: Scattered information: philosophy and practice of near infrared spectroscopy. 11<sup>th</sup> International Conference on Near Infrared Spectroscopy, Cordoba, Spain, 2003. Vortragsunterlagen online verfügbar unter <http://www2.hcmuaf.edu.vn/data/phyenphuong/opticsfinal.ppt>
- Nadesalingam J, Plante Y, Gibson JP: Detection of QTL for milk production on Chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. *Mamm Genome* 2001;12(1):27-31
- NCBI (National Center for Biotechnology Information): Bos taurus (cattle) genome view. Btau 4.0 vom 05.08.2008 [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map\\_search.cgi?taxid=9913](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/map_search.cgi?taxid=9913)
- NC-IUB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry): Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences. Recommendations 1984. *Biochem J* 1985;229:281-286; *Eur J Biochem* 1985;150:1-5; *J Biol Chem* 1986;261:13-17; *Mol Biol Evol* 1986;3:99-108; *Nucl Acids Res*

- 1985;13:3021-3030; *Proc Nat Acad Sci (US)* 1986;83:4-8; Biochemical Nomenclature and Related Documents. Portland Press, London, 2<sup>nd</sup> Ed., 1992;122-126
- NC-IUBMB: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the nomenclature and classification of enzymes by the reactions they catalyse. Academic Press, San Diego, 1992
- Näslund J, Fikse WF, Pielberg GR, Lunden A: Frequency and effect of the bovine acylCoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) K232A polymorphism in Swedish dairy cattle. *J Dairy Sci* 2008;91:2127-2134
- Noci F, Monahan FJ, French P, Moloney AP: The fatty acid composition of muscle fat and subcutaneous adipose tissue of pasture-fed beef heifers: influence of the duration of grazing. *J Anim Sci* 2005;83:1167-1178
- Ntambi JM, Miyazaki M: Regulation of stearoyl-CoA desaturases and role in metabolism. *Prog Lipid Res* 2004;43:91-104
- Nürnberg K, Ender K: Qualität von der Weide. *Forschungsreport* 2006;2:21-23
- Nürnberg K, Nürnberg G: Bericht über die Standardisierung im Rahmen des FUGATO-Projektes „QuaLIPID“. projektinterne Kommunikation, 2008
- Obregon MJ: Thyroid hormone and adipocyte differentiation. *Thyroid* 2008;18(2):185-195.
- Olsen HG, Lien S, Svendsen M, Nilsen H, Roseth A, Aasland Opsal M, Meuwissen THE: Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. *J Dairy Sci* 2004;87(3):690-698
- Pitchford WS, Deland MPB, Siebert BD, Malau-Aduli AEO, Bottema CDK: Genetic variation in fatness and fatty acid composition of crossbred cattle. *J Anim Sci* 2002;80:2825-2832
- Prevolnik M, Candek-Potokar M, Skorjanc D: Ability of NIR spectroscopy to predict meat chemical composition and quality - a review. *Czech J Anim Sci* 2004;49(11):500-510
- Puigserver P, Wu Z, Park CW, Graves R, Wright M, Spiegelman BM: A cold-inducible coactivator of nuclear receptors linked to adaptive thermogenesis. *Cell* 1998;92:829-839
- Puigserver P, Spiegelman BM: Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator 1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ): transcriptional coactivator and metabolic regulator. *Endocrine Reviews* 2003;24(1):78-90
- Realini CE, Duckett SK, Windham WR: Effect of vitamin C addition to ground beef from grass-fed or grain-fed sources on color and lipid stability, and prediction of fatty acid composition by near-infrared reflectance analysis. *Meat Science* 2004;68:35-43
- Reicheneder D, Kämmerer S, Flisikowski K, Schuster M, Schwarz FJ, Fries R, Schwarzenbacher H: Variation of the bovine acyl-CoA dehydrogenase 9 (ACAD9) gene is associated with *trans* fatty acid content in milk. *in Vorbereitung*
- Rincker CB, Pyatt NA, Berger LL, Faulkner D: Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. *J Anim Sci* 2006;84:686-93
- Rosen ED, Sarraf P, Troy AE, Bradwin G, Moore K, Milstone DS, Spiegelman BM, Mortensen RM: PPAR $\gamma$  is required for the differentiation of adipose tissue in vivo and in vitro. *Mol Cell* 1999;4:611-617
- Rozen S, Skaletsky HJ: Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA (Eds.): Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, NJ, USA, 2000;132:365-386

- Programm online unter [http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3\\_www.cgi](http://fokker.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi)
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (Eds.): Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York, USA, 2<sup>nd</sup> Ed., 1989
- Sanders K, Bennewitz J, Reinsch N, Thaller G, Prinzenberg EM, Kühn C, Kalm E: Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promotor in the German Angeln dairy cattle population. *J Dairy Sci* 2006;89:3164-3174
- Sandorfy C, Buchet R, Lachenal G: Principles of molecular vibrations for near-infrared spectroscopy. In: Ozaki Y, McClure WF, Christy AA (Eds.): Near-infrared spectroscopy in food science and technology. Wiley-Interscience, Hoboken, NJ, USA, 2007;11-46
- SAS: SAS/ STAT Software Release. SAS Institute Inc, Cary, NC, USA, 2002
- Schennink A, Stoop WM, Visker MHPW, Heck JML, Bovenhuis H, van der Poel JJ, van Valenberg HJF, van Arendonk JAM: DGAT1 underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. *Anim Genet* 2007;38(5):467-473
- Schilling MM, Oeser JK, Boustead JN, Flemming BP, O'Brien RM: Gluconeogenesis: re-evaluating the FOXO1-PGC-1 $\alpha$  connection. *Nature* 2006;443(7111):E10-11
- Schüler L, Swalve H, Götz KU: Grundlagen der quantitativen Genetik. Ulmer, Stuttgart, 2001
- Schuster M, Oppelt S, Reinhardt C: Methoden und Kapazitäten zur Untersuchung von Fleischqualitätsparametern im Zentrallabor Grub. Vortrag im Rahmen des Fachgespräches über die züchterischen Möglichkeiten zur Verbesserung der Fleischqualität in Bayern, Institut für Tierzucht, Bayerische Landesanstalt für Landwirtschaft, 30.01.2004
- Scollan N, Hocquette JF, Nürnberg K, Dannenberger D, Richardson I, Moloney A: Innovations in beef production systems that enhance the nutritional and health value of beef lipids and their relationship with eating quality. *Meat Science* 2006;74:17-33
- Sierra V, Aldai N, Castro P, Osoro K, Coto-Montes A, Olivan M: Prediction of the fatty acid composition of beef by near infrared transmittance spectroscopy. *Meat Science* 2008;78(3):248-255
- Spelman RJ, Ford CA, McElhinny P, Gregory GC, Snell RG: Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *J Dairy Sci* 2002;85:3514-3517
- Suzuki K, Ishida M, Kadowaki H, Shibata T, Uchida H, Nishida A: Genetic correlations among fatty acid compositions in different sites of fat tissues, meat production, and meat quality traits in Duroc pigs. *J Anim Sci* 2006;84:2026-2034
- Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S: Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mamm Genome* 2004;15(2):142-148
- Thaller G, Kühn C, Winter A, Ewald G, Bellmann O, Wegner J, Zühlke H, Fries R: DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Anim Genet* 2003a;34:354-357
- Thaller G, Krämer W, Winter A, Kaupe B, Erhardt G, Fries R: Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J Anim Sci* 2003b;81:1911-1918
- Thorpe C, Kim JP: Structure and mechanism of action of the Acyl-CoA dehydrogenases. *FASEB J* 1995;9(9):718-725
- Tillmann P: Kalibrationsentwicklung für NIRS-Geräte. Eine Einführung. (Stand 11.10.2006), PDF-Dokument, 137 S, Print-Version (ältere Ausgabe): Tillmann P: Kalibrationsentwicklung für NIRS-Geräte. Eine Einführung. Cuvillier, Göttingen 2000

- van Eenennaam AL, Li J, Thallman RM, Quaas RL, Dikeman ME, Gill CA, Franke DE, Thomas MG: Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J Anim Sci* 2007;85:891-900
- van Laere AS, Nguyen M, Braunschweig M, Nezer C, Collette C, Moreau L, Archibald AL, Haley CS, Buys N, Tally M, Andersson G, Georges M, Andersson L: A regulatory mutation in IGF2 causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. *Nature* 2003;425:832-836
- Vega RB, Huss JM, Kelly DP: The coactivator PGC-1 cooperates with peroxisome proliferator-activated receptor  $\alpha$  in transcriptional control of nuclear genes encoding mitochondrial fatty acid oxidation enzymes. *Mol Cell Biol* 2000;20(5):1868-1876
- Viitala SM, Schulman NF, de Koning DJ, Elo K, Kinoshita R, Virta A, Virta J, Mäki-Tanila A, Vilkkii JH: Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshire dairy cattle. *J Dairy Sci* 2003;86(5):1828-1836
- Vincze T, Posfai J, Roberts RJ: NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acid Res* 2003;31:3688-3691  
Programm online verfügbar unter: <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php> (10.06.2009)
- Voet D, Voet JG, Pratt CW, Beck-Sickinger AG, Asperger O (Hrsg.): Lehrbuch der Biochemie. Wiley-VCH, Weinheim 2002
- Vuori K, Strandén I, Lidauer M, Mäntysaari EA: MiX99 - effective solver for large and complex linear mixed models. Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 13.-18.08.2006, Belo Horizonte, Brazil, No 27-33
- Warnants N, Van Oeckel MJ, Boucque CV: Effect of incorporation of dietary polyunsaturated fatty acids in pork backfat on the quality of salami. *Meat Sci* 1998;49(4):435-445
- Warren HE, Scollan ND, Enser M, Hughes SI, Richardson RI, Wood JD: Effects of breed and a concentrate or grass silage diet on beef quality in cattle of 3 ages. I: Animal performance, carcass quality and muscle fatty acid composition. *Meat Sci* 2008;78:256-269
- Weikard R, Kühn C, Goldammer T, Freyer G, Schwerin M: The bovine PPARGC1A gene: molecular characterization and association of an SNP with variation of milk fat synthesis. *Physiol Genomics* 2005;21:1-13
- Williams PC: Implementation of near infrared technology. In: Williams PC, Norris KH (Eds.): Near infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004;145-169
- Williams PC, Norris K: Variables affecting near-infrared spectroscopic analysis. In: Williams PC, Norris KH (Eds.): Near infrared technology in the agricultural and food industries. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, MN, USA, 2<sup>nd</sup> Ed., 2004;171-185
- Windham WR, Morrison WH: Prediction of fatty acid content in beef neck lean by near infrared reflectance analysis. *J Near Infrared Spectrosc* 1998;6:229-235
- Winter A, Krämer W, Werner FA, Kollers S, Kata S, Durstewitz G, Buitkamp J, Womack JE, Thaller G, Fries R: Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(14):9300-9305
- Wood JD, Enser M: Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. *Br J Nutr* 1997;78 (Suppl. 1):S49-S60
- Wood JD, Nute GR, Richardson RI, Whittington FM, Southwood O, Plastow G,



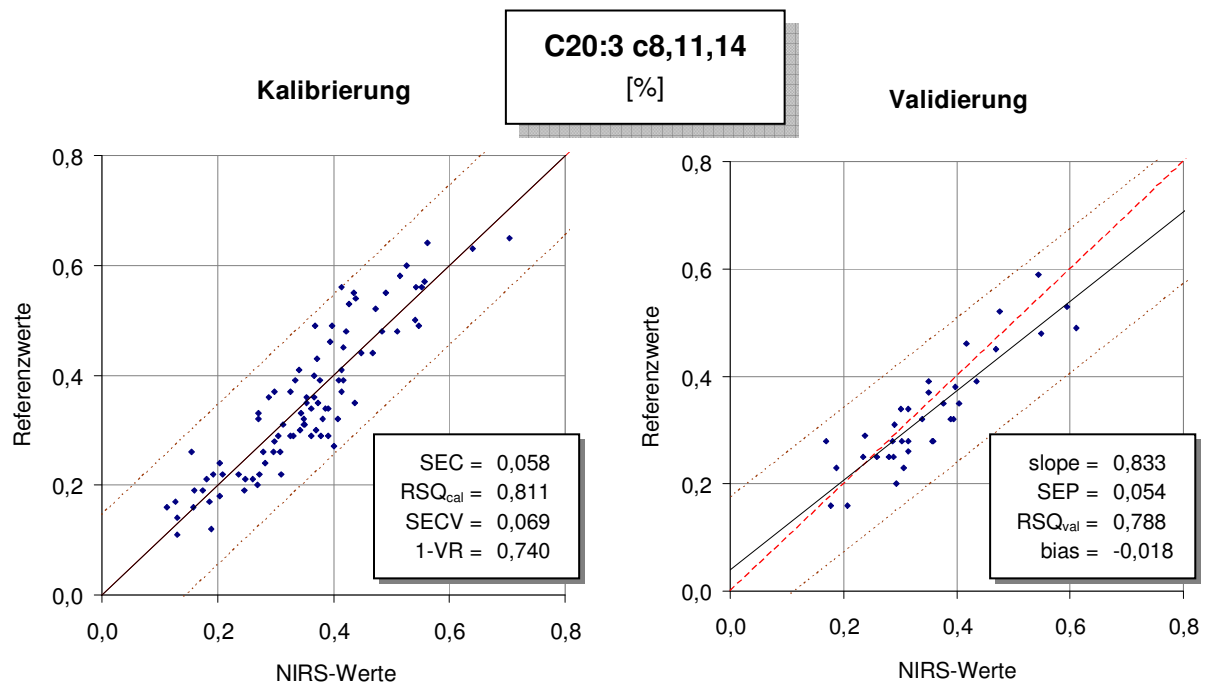
- Mansbridge R, da Costa N, Chang KC: Effect of breed, diet and muscle on fat deposition and eating quality in pigs. *Meat Sci* 2004;67:651-667
- Wood JD, Enser M, Fisher AV, Nute GR, Sheard PR, Richardson RI, Hughes SI, Whittington FM: Fat deposition, fatty acid composition and meat quality: A review. *Meat Science* 2008;78:343-358
- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM: An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acid Res* 2001;29(17):e88 1-8
- Yoon JC, Puigserver P, Chen G, Donovan J, Wu Z, Rhee J, Adelmant G, Stafford J, Kahn CR, Granner DK, Newgard CB, Spiegelman BM: Control of hepatic gluconeogenesis through the transcriptional coactivator PGC-1. *Nature* 2001;413(6852):131-138
- You FM, Huo N, Gu YQ, Luo MC, Ma Y, Hane D, Lazo GR, Dvorak J, Anderson OD: BatchPrimer3: a high throughput web application for PCR and sequencing primer design. *BMC Bioinformatics* 2008;9:253  
Programm online unter <http://probes.pw.usda.gov/batchprimer3/overview.html>
- ZDS - Zentralverband der Deutschen Schweineproduktion e.V.: Richtlinie für die Stationsprüfung auf Mastleistung, Schlachtkörperwert und Fleischbeschaffenheit beim Schwein vom 04.09.2007
- Zhang J, Zhang W, Zou D, Chen G, Wan T, Zhang M, Cao X: Cloning and functional characterization of ACAD-9, a novel member of human acyl-CoA dehydrogenase family. *BBRC* 2002;297:1033-1042
- Zhang Q, Boichard D, Hoeschele I, Ernst C, Eggen A, Murkve B, Pfister-Genskow M, Witte LA, Grignola FE, Uimari P, Thaller G, Bishop MD: Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. *Genetics* 1998;149(4):1959-1973
- Zhang S, Knight T, Minick J, Tait R, Trenkle A, Wilson D, Rouse G, Strohbehn D, Reecy J, Beitz D: Association of genetic variation to healthfulness of beef. *Iowa State University Animal Industry Report* 2005, ASL-R2009
- Zhang S, Knight TJ, Reecy JM, Beitz DC: DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. *Anim Genet* 2008;39:62-70

## **ANHANG**

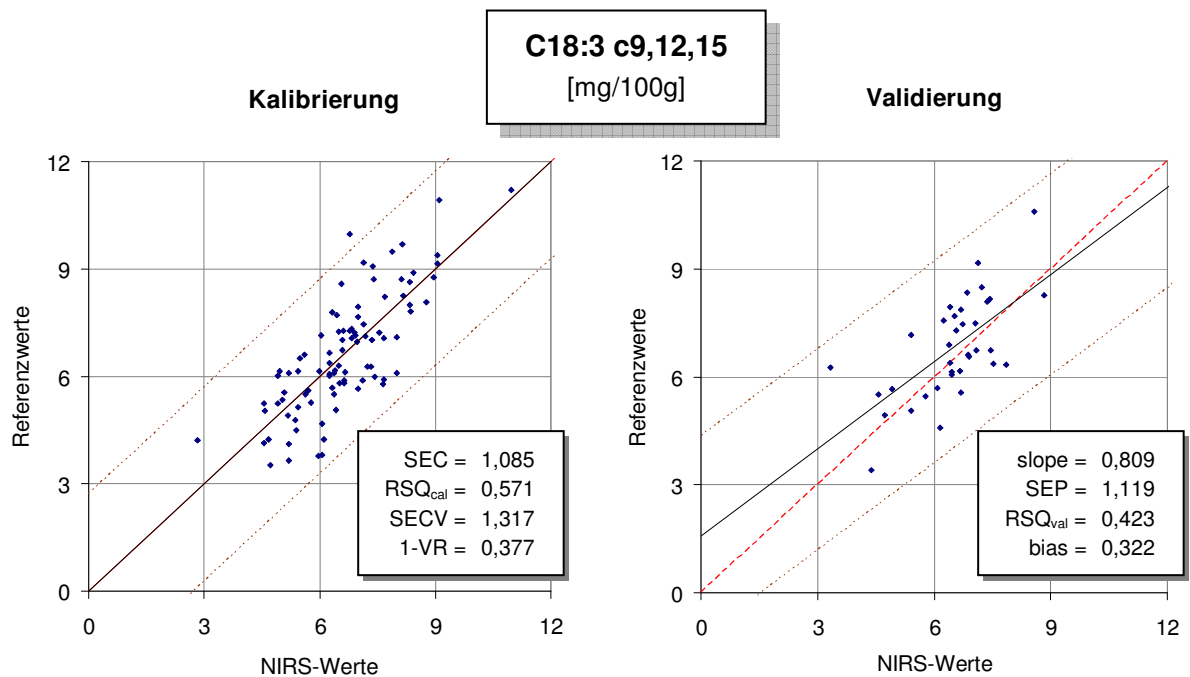
XY-Grafiken von Kalibrierung und Validierung ausgewählter Parameter

Korrelationen zwischen Fettsäureparametern und IMF

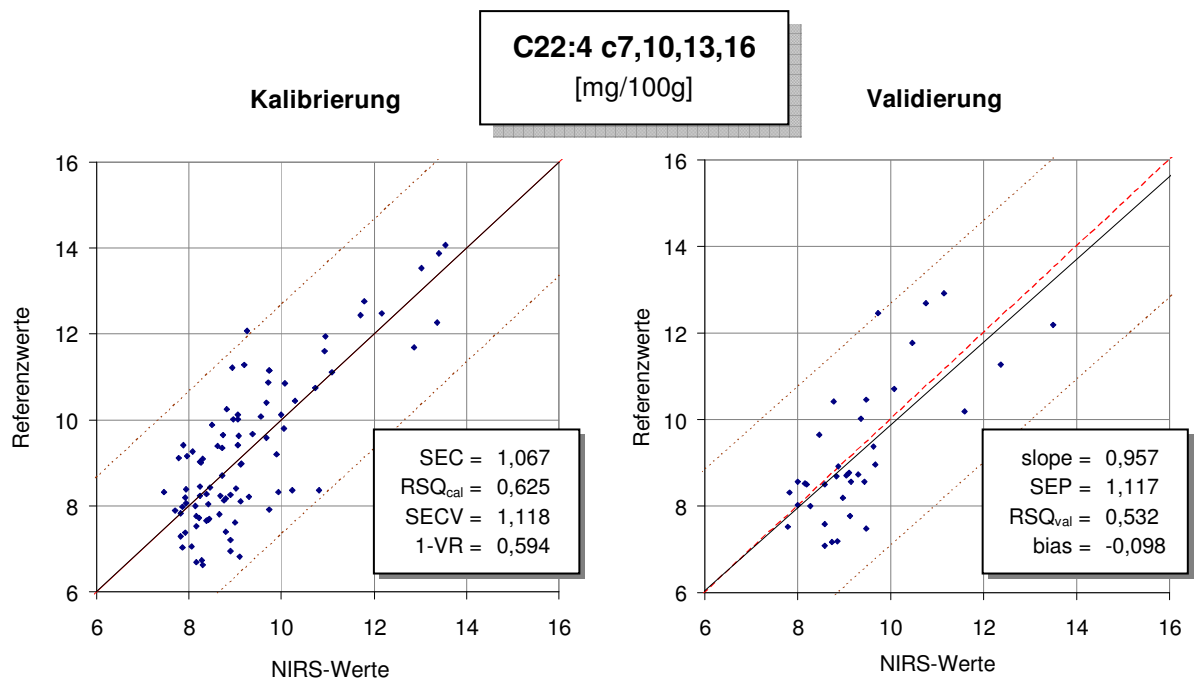
Übersicht der verwendeten Geräte, Materialien, Chemikalien, GenBank Accession  
Numbers und Primersequenzen



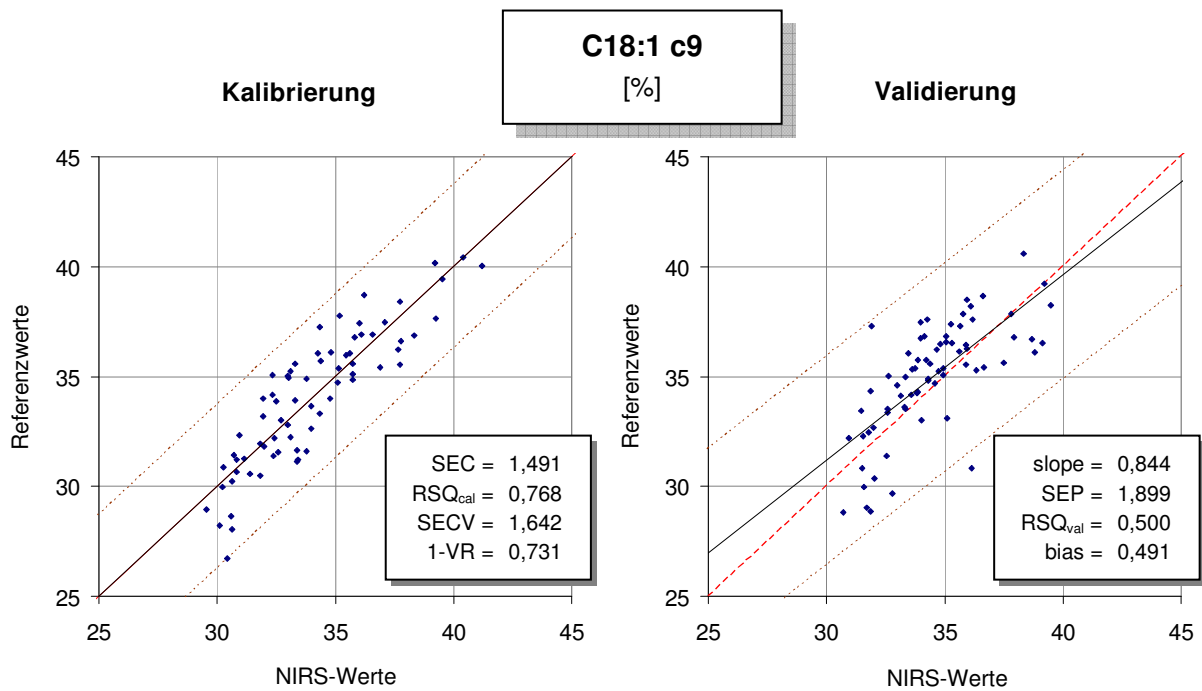
**Abb. A1:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung von Di-homo- $\gamma$ -Linolensäure [%] in Rindfleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - Winkelhalbierende)



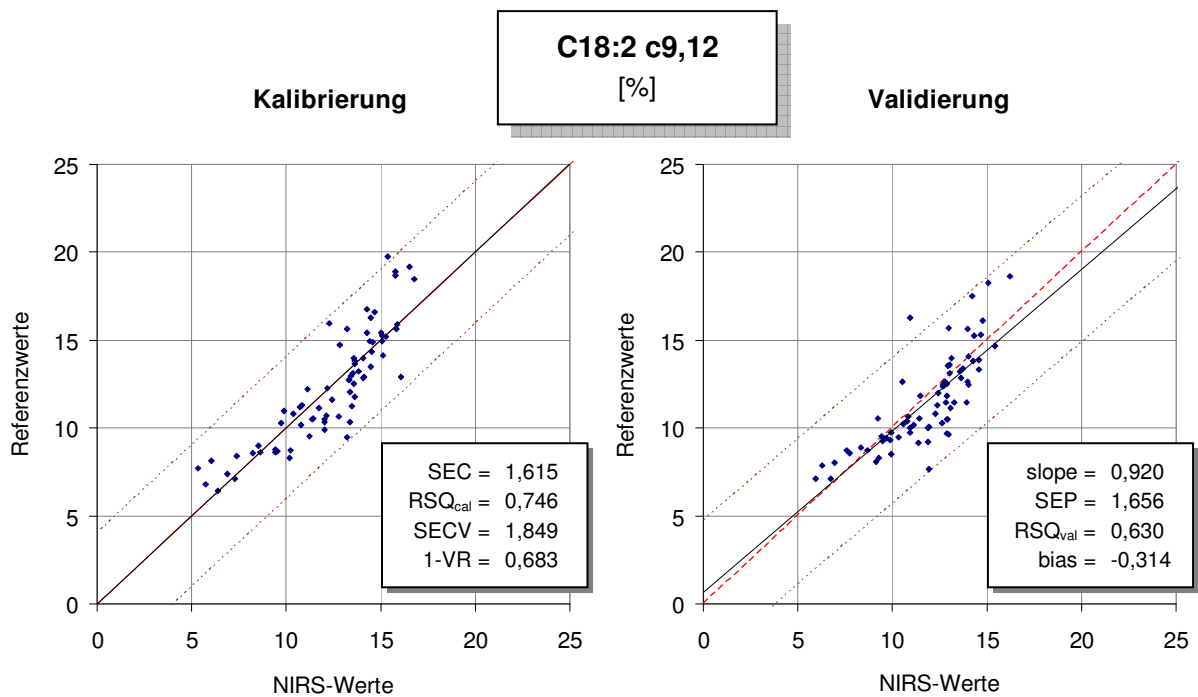
**Abb. A2:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung von  $\alpha$ -Linolensäure [mg/100 g] in Rindfleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - Winkelhalbierende)



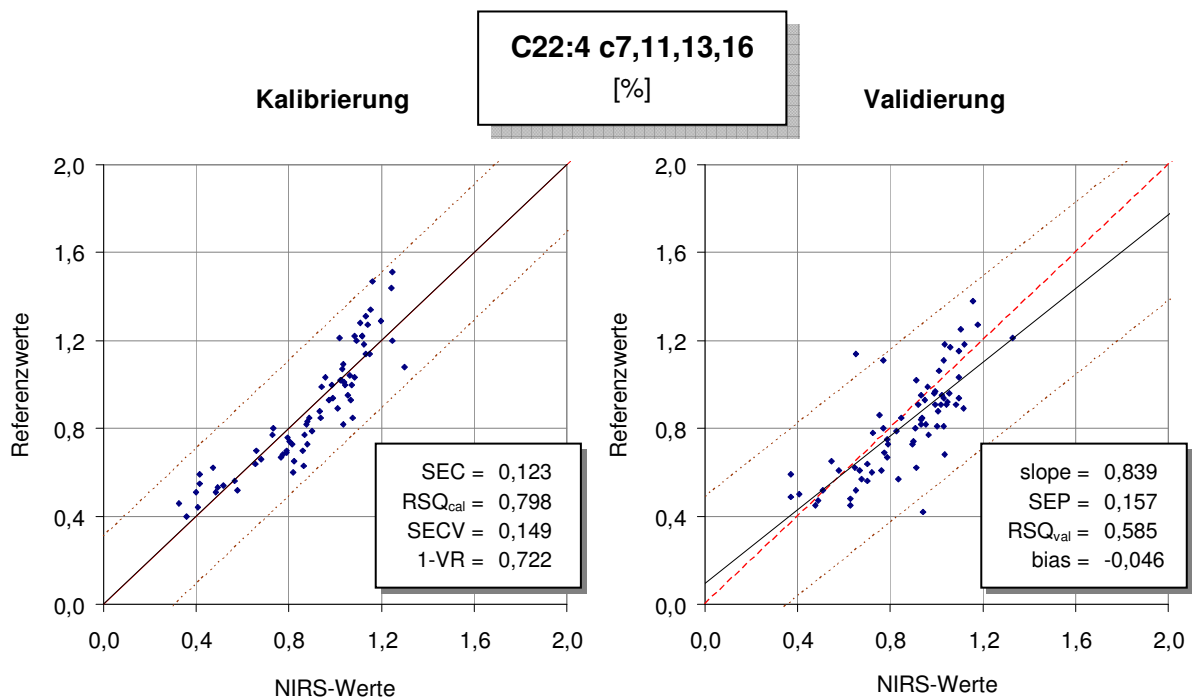
**Abb. A3:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung von Adrensäure [mg/100 g] in Rindfleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - - Winkelhalbierende)



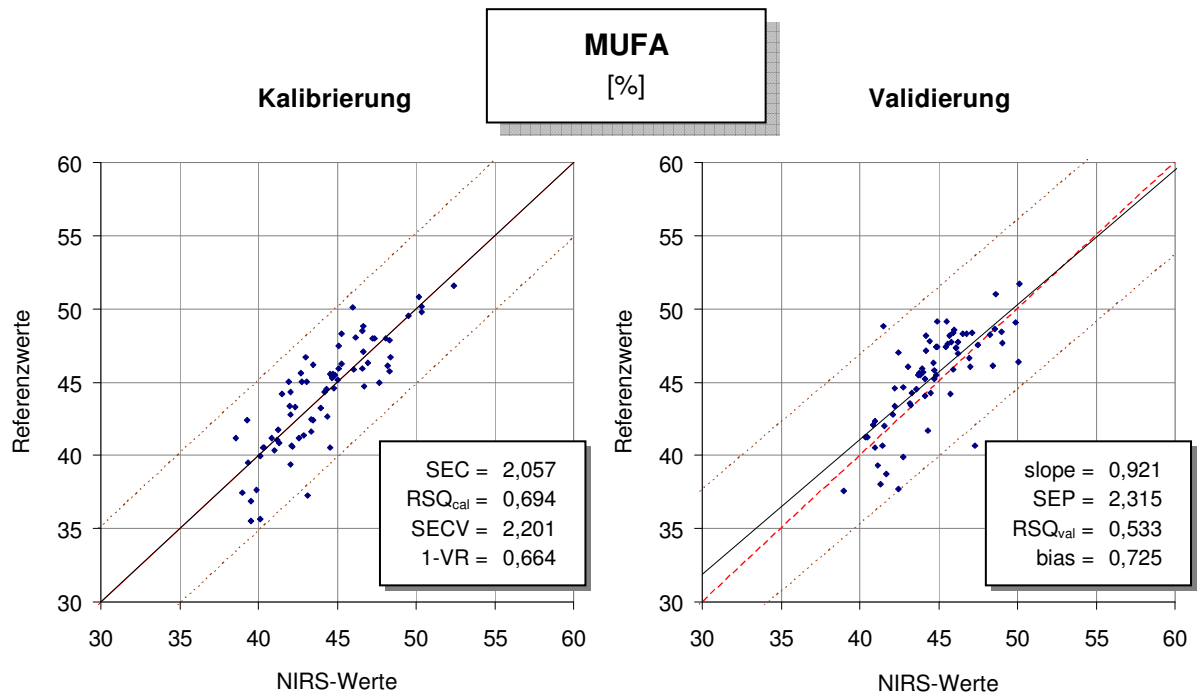
**Abb. A4:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung von Ölsäure [%] in Schweinefleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - - Winkelhalbierende)



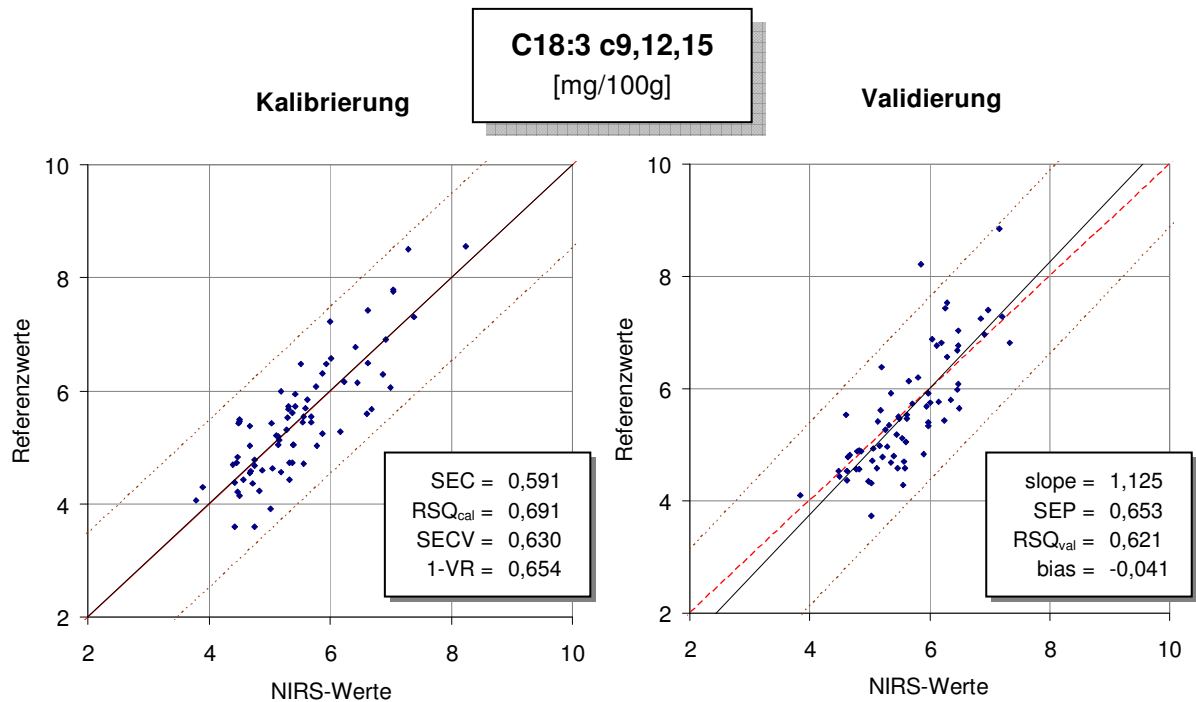
**Abb. A5:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung von Linolsäure [%] in Schweinefleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - - Winkelhalbierende)



**Abb. A6:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung von Adrensäure [%] in Schweinefleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - - Winkelhalbierende)



**Abb. A7:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung des Summenparameters einfach ungesättigter Fettsäuren [%] in Schweinefleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - - Winkelhalbierende)



**Abb. A8:** XY-Grafiken der Kalibrierung und Validierung von  $\alpha$ -Linolensäure [mg/100 g] in Schweinefleisch  
(— Regressionsgerade, ..... t-Ausreißergrenze, - - - Winkelhalbierende)

**Tab. A1:** Korrelationskoeffizienten der Fettsäureparameter mit dem IMF<sup>16</sup>

	Korrelationskoeffizient r			
	Rind		Schwein	
	%	mg/100 g	%	mg/100 g
<i>Einzelfettsäuren</i>				
C14:0	0,46	0,95	0,75	0,96
C14:1 c9	0,60	0,90		
C15:0	-0,28	0,82		
C16:0	0,52	0,98	0,69	0,98
C16:1 t9	-0,66	0,30		
C16:1 c9	0,57	0,95	0,51	0,93
C17:0	-0,14	0,91	-0,39	0,47
C18:0	-0,39	0,95	0,32	0,95
ΣC18:1 <i>trans</i>	-0,15	0,89	0,10	0,92
C18:1 c9	0,72	0,98	0,72	0,97
C18:1 c11	-0,04	0,96	0,33	0,96
C18:2 c9,12	-0,79	0,09	-0,80	0,56
CLA c9 t11	0,16	0,83		
C18:3 c6,9,12	-0,74	-0,43	-0,69	0,20
C18:3 c9,12,15	-0,46	0,47	-0,72	0,76
C20:0	-0,54	0,88	0,38	0,87
C20:1 c11	0,51	0,91	0,54	0,94
C20:2 c11,14	-0,73	-0,01	-0,49	0,68
C20:3 c8,11,14	-0,72	0,63	-0,81	0,37
C20:4 c5,8,11,14	-0,81	0,17	-0,78	0,06
C20:5 c5,8,11,14,17	-0,63	0,07	-0,79	0,21
C22:4 c7,10,13,16	-0,80	0,51	-0,77	0,22
C22:5 c4,7,10,13,16	-0,72	0,29	-0,68	0,11
C22:5 c7,10,13,16,19	-0,73	0,29	-0,76	0,06
C22:6 c4,7,10,13,16,19			-0,57	-0,04
C24:0			-0,03	0,71
C24:1 c15	0,57	0,93		
<i>Summenparameter</i>				
SFA	0,17	0,98	0,59	0,98
MUFA	0,75	0,98	0,72	0,98
PUFA	-0,80	0,58	-0,81	0,51
Σn-3	-0,64	0,37	-0,79	0,48
Σn-6	-0,81	0,22	-0,81	0,49

<sup>16</sup> der Berechnung liegen die referenzmethodisch bestimmten Daten für die NIRS-Kalibrationsentwicklung zu Grunde

## FETTSÄUREANALYTIK

### a) Geräte

Mühle:	Messermühle Grindomix GM 200 ( <i>Retsch</i> , Haan, Deutschland)
Vakuumiergerät:	Röschermatic VM T5 ( <i>Röscher</i> , Bersenbrück, Deutschland)
Analysenwaage :	Analytical Plus AP310 ( <i>Ohaus</i> , Pine Brook, USA)
Dispenser:	Dispensette analog 2,5 - 25 ml und Dispensette organic analog 5 - 50 ml (beide <i>Brand</i> , Wertheim, Deutschland) Fortuna Optifix 6 - 30 ml ( <i>Poulten &amp; Graf</i> , Wertheim, Deutschland)
Dispergiergerät :	Ultra Turrax T 25 basic mit Dispergierwerkzeug S 25N - 10G ( <i>IKA</i> , Staufen, Deutschland)
Schüttler:	Certomat R ( <i>B. Braun</i> , Melsungen, Deutschland) LabDancer ( <i>VWR</i> , Ismaning, Deutschland)
Evaporator:	TurboVap LV Evaporator ( <i>Zymark</i> , Hopkinton, USA)
Pipetten:	Transferpettor Digital 20 - 100 µl, Transferpette Digital 100 - 1000 µl und 10 - 100 µl (alle <i>Brand</i> , Wertheim, Deutschland) Proline Mechanisch 1 - 5 ml ( <i>Biohit</i> , Rosbach v. d. Höhe, Deutschland)
GC:	6890N Network GC System mit FID und Probengeber 7683B ( <i>Agilent Technologies</i> , Waldbronn, Deutschland)
GC-Säule:	Kapillarsäule SP-2380: 100 m x 0,25 mm; 0,2 µm Filmdicke ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland) mit Vorsäule Fused Silica: 1 m x 0,25 mm; deaktiviert ( <i>Agilent Technologies</i> , Waldbronn, Deutschland)
Liner:	Focus Liner, konisch, 4 mm, mit Glaswolle ( <i>Agilent Technologies</i> , Waldbronn, Deutschland)

### b) Standardsubstanzen

CLA c9, t11-ME	Art.No. 1255; Methyl 9(Z),11(E)-octadecadienoate ( <i>Matreya</i> , Pleasant Gap, USA)
CLA t10, c12-ME	Art.No. 1254; Methyl 10(E),12(Z)-octadecadienoate ( <i>Matreya</i> , Pleasant Gap, USA)



CLA c9, c11-ME	Art.No. 1256; Methyl 9(Z),11(Z)-octadecadienoate ( <i>Matreya</i> , Pleasant Gap, USA)
Docosapentaensäure-ME: (n-6)	Art.No. 20-2265-7; Methyl Docosapentaenoate c4, c7, c10, c13, c16 ( <i>Larodan</i> , Malmö, Schweden)
Docosapentaensäure-ME: (n-3)	Art.No. 17269; Methyl all- <i>cis</i> -7,10,13,16,19-docosapentaenoate ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Docosatetraensäure-ME:	Art.No. D3534; <i>cis</i> -7,10,13,16-Docosatetraenoic acid methyl ester ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Docosatriensäure-ME:	Art.No. D3909; <i>cis</i> -13,16,19-Docosatrienoic acid methyl ester ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
FAME Mix:	Art.No. 47885-U; Supelco 37 Component FAME Mix ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Heneicosansäure-ME:	Art.No. 51535; Methyl heneicosanoate ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Palmitelaidinsäure-ME:	Art.No. 76117; Methyl palmitelaidate ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Petroselaidinsäure-ME:	Art.No. 47199; <i>trans</i> -6-Petroselaidic Methyl Ester ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Stearidonsäure-ME	Art.No. 20-1840-4; Methyl Octadecatetraenoate ( <i>Larodan</i> , Malmö, Schweden)
<i>trans</i> -Vaccensäure-ME:	Art.No. 46905-U; <i>trans</i> -11-Vaccenic Methyl Ester ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Vaccensäure-ME:	Art.No. V-1256; <i>cis</i> -Vaccenic Acid Methyl Ester ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)

### c) Chemikalien & Gase

Methanol:	p.A.; Art.No. 1.06009.2500 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
Chloroform:	p.A.; Art.No. 1.02445.2500 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
Kaliumchlorid:	p.A.; Art.No. 1.04936.0500 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
Natriumsulfat:	reinst, wasserfrei; Art.No. 1.06645.2500 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
tBME:	GC-Qualität; Art.No. 1.01995.2500; tert-Butylmethylether ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
BHT:	Art.No. 8.22021.0100; 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)

TMSH:	0,25 M in Methanol; Art.No. 92732; Trimethylsulfonium hydroxide solution ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Stickstoff:	4.6 ( <i>Air Liquide</i> , Düsseldorf, Deutschland)
Helium:	4.6 ( <i>Air Liquide</i> , Düsseldorf, Deutschland) über Feuchtigkeitsfilter und Sauerstofffalle (beides <i>Varian</i> , Darmstadt, Deutschland)
Wasserstoff:	5.0 ( <i>Air Liquide</i> , Düsseldorf, Deutschland)
Druckluft:	Hausanlage mit Kompressor, Aktivkohlefilter und Feuchtigkeitsfilter

#### d) Verbrauchsmaterial

Faltenfilter:	Faltenfilter, 150 mm, 65 g/cm <sup>2</sup> ; Art.No. 4.303.150 ( <i>Munktel</i> , Bärenstein, Deutschland)
Vials:	Gewindeflaschen, Art.No. 5182-0716; mit Schraubkappen, Art.No. 5182-0723 (beides <i>Agilent Technologies</i> , Waldbronn, Deutschland)
Inserts:	100 µl-Glaseinsätze mit Polymerfüßen, Art.No. 5181-1270 ( <i>Agilent Technologies</i> , Waldbronn, Deutschland)

## MOLEKULARGENETISCHE UNTERSUCHUNGEN

#### a) Geräte

Pipetten:	Transferpette Digital 100 - 1000 µl; 10 - 100 µl; 2 - 20 µl; 0,5 - 10 µl und 0,1 - 1 µl (alle <i>Brand</i> , Wertheim, Deutschland) EDP3-basic 2 - 20 µl Einkanal- und Mehrkanalpipette (beide <i>Rainin</i> , Woburn, USA) Multipette plus ( <i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland)
Schüttler:	MS 1 Minishaker ( <i>IKA</i> , Staufen, Deutschland) Vortex Mixer ( <i>Neolab</i> , Heidelberg, Deutschland) MS 3 basic mit Mikrotiteraufsatz ( <i>IKA</i> , Staufen, Deutschland)
Zentrifugen:	Z 513 K ( <i>Hermle Labortechnik</i> , Wehingen, Deutschland) Centrifuge 5415 D ( <i>Eppendorf</i> , Hamburg, Deutschland) Mini Centrifuge MCF-2360 ( <i>LMS</i> , Tokyo, Japan)

Spektrophotometer:	NanoDrop 1000 ( <i>Thermo Scientific</i> , Wilmington, USA)
PCR-Maschinen:	TGradient ( <i>Biometra</i> , Göttingen, Deutschland) T1 Thermocycler ( <i>Biometra</i> , Göttingen, Deutschland)
Elektrophoresesysteme:	Elektrophoresesystem Modell B1A und B2 (beide <i>Peqlab</i> , Erlangen, Deutschland)
Spannungsquellen:	Voltcraft PPS-12008 ( <i>Conrad</i> , München, Deutschland) Consort E143 ( <i>Peqlab</i> , Erlangen, Deutschland)
Geldokumentationssystem:	UV-System mit Videoprinter ( <i>Intas</i> , Göttingen, Deutschland)
DNA-Sequenzier:	ABI prism 3100-Avant Genetic Analyser ( <i>Applied Biosystems</i> , Foster City, USA)

## **b) DNA-Polymerase, DNA-Marker & Restriktionsenzyme**

DNA-Polymerase:	HotStarTaq DNA-Polymerase; Art.No. 203207 ( <i>Qiagen</i> , Hilden, Deutschland)
DNA-Marker:	GeneRuler DNA Ladder, Low Range; Art.No. SM1193 und GeneRuler Express DNA Ladder; Art.No. SM1553 (beide <i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot, Deutschland)
Restriktionsenzyme:	<i>Bst</i> Y, Art.No. R0523S ( <i>New England Biolabs</i> , Frankfurt am Main, Deutschland) <i>Cfr</i> I, Art.No. ER0161, <i>Eco</i> 31I, Art.No. ER0291 und <i>Msp</i> I, Art.No. ER1211 (alle <i>Fermentas</i> , St. Leon-Rot, Deutschland)

## **c) Chemikalien & Puffer**

Natriumchlorid:	Art.No. 1.16224.5000 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
NP40:	Nonidet P 40 Substitute solution, Art.No. 743886 ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Proteinase K:	Art.No. 1.24568.0500 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland) - Arbeitslösung: 20 mg/ml
SDS:	Sodium dodecyl sulfate solution, Art.No. 71736 ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
Isopropanol:	Art.No. 1.09634.1000 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
Ethanol:	Art.No. 1.00974.2511 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland)
dNTPs:	dATP, Art.No. K035.1; dCTP, Art.No. K038.1; dGTP, Art.No. K037.1; dTTP, Art.No. K036.1 (alle <i>Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland), mit HPLC-Wasser verdünnen - Arbeitslösung: 2 mM

Wasser:	HPLC Grade; Chromasolv Plus, Art.No. 34877-1L ( <i>Sigma-Aldrich</i> , Taufkirchen, Deutschland)
PCR Purification Kit:	QIAquick PCR Purification Kit, Art.No. 28106 ( <i>Qiagen</i> , Hilden, Deutschland)
Sequencing Kit:	BigDye Terminator v2.0 Cycle Sequencing Kit, Art.No. 4314419 ( <i>Applied Biosystems</i> , Foster City, USA)
Purification Kit:	BigDye XTerminator Purification Kit, Art.No. 4376487 ( <i>Applied Biosystems</i> , Foster City, USA)
Polymer für Sequenzer:	POP-4 Polymer, Art.No. 4316355 ( <i>Applied Biosystems</i> , Foster City, USA)
Laufpuffer Sequenzer:	Running Buffer 10x, Art.No. 402824 ( <i>Applied Biosystems</i> , Foster City, USA)
Agarose:	Rotigarose NEEO Ultra-Qualität, Art.No. 2267.4 ( <i>Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland)
Ethidiumbromid:	Biotechnology Grade; Art.No. X328 ( <i>Amresco</i> , Solon, USA)
TAE-Puffer:	Tris-Acetat-EDTA-Puffer 50x; Art.No. 1.06174.1000 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland) - zur Verwendung mit A. bidest verdünnt auf 1x
EDTA-Puffer (pH 8):	186,1 g Ethylendiamintetraessigsäure di-Natriumsalz-Dihydrat, Art.No. 1.08454.1000 ( <i>Merck</i> , Darmstadt, Deutschland) und 800 ml A. bidest auf Magnetrührer mischen, pH 8 mit NaOH, Art.No. 6771.1 ( <i>Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland), einstellen - Konzentration: 0,5 M
Tris-Puffer (pH 8):	121,1 g Tris base, Art.No. 4855.2 ( <i>Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland), in 800 ml A. bidest lösen, pH 8 mit konz. HCl, Art.No. P074.1 ( <i>Roth</i> , Karlsruhe, Deutschland), einstellen, auf 1 l auffüllen, 1:100 mit A. bidest verdünnen - Konzentration: 10 mM
PK-Puffer (pH 7,4):	Proteinase K-Puffer; 20 mM Tris (s. Tris-Puffer), 4 mM EDTA (s. EDTA-Puffer), 100 mM NaCl
TE-Puffer (pH 8):	10 mM Tris pH 8 (s. Tris-Puffer), 1 mM EDTA pH 8 (s. EDTA-Puffer)

#### d) GenBank Accession Numbers, Primersequenzen & Temperaturen

Nachfolgend sind die zur Sequenzierung und Typisierung verwendeten Primer angegeben. Das für Typisierungen nach dem tetra-Primer-ARMS-Prinzip aufgeführte äußere Primerpaar wurde zur Sequenzierung eingesetzt.

<u><i>ACAD9</i></u>		GenBank Accession No. BT030493
<i>ACAD9</i> c.1036G>T 55,5 °C	outer forward	5'-CAGTTCAACAGGAACCTCAG-3'
	outer reverse	5'-TGAGACATAGAAAGGCCGTA-3'
	inner forward	5'-GACACTCCAGGAGAAGTCTG-3'
	inner reverse	5'-CTTCTGCGCCATCAGAGA-3'
<i>ACAD9</i> c.1392G>T 60,0 °C	forward	5'-TGGCTTTTACAACCAGACCA-3'
	reverse	5'-GCTTCTGCCGAGCTGAATAG-3'
<u><i>DGAT1</i></u>		GenBank Accession No. AJ318490
<i>DGAT1</i> p.K232A 58,0 °C	forward	5'-TACACCATCCTCTTCCTCAAG-3'
	reverse	5'-GGAAGCGCTTTCGGATG-3'
<u><i>FASN</i></u>		GenBank Accession No. AF285607
<i>FASN</i> c.17924A>G 60,0 °C	forward	5'-ACCTTGACACGGCTCAACTC-3'
	reverse	5'-GTAGGAGTAGCCAGCGATGC-3'
<u><i>PPARGC1A</i></u>		GenBank Accession No. AY321517 und AY547555
<i>PPARGC1A</i> c.1847C>T 60,0 °C	outer forward	5'-CAGGGGCTACTCAGTCATGC-3'
	outer reverse	5'-ATGAAAGTAAGCTCCAGGCTGCT-3'
	inner forward	5'-GCACACACCGAAATTCTGC-3'
	inner reverse	5'-AACGTGACGCGCACATGA-3'
<i>PPARGC1A</i> c.1892-19T>C 60,0 °C	outer forward	5'-CAGGGGCTACTCAGTCATGC-3'
	outer reverse	5'-ATGAAAGTAAGCTCCAGGCTGCT-3'
	inner forward	5'-CCAGGTAATGATGCACGTTCTCC-3'
	inner reverse	5'-AGGGATAAGAGGCACGGAGGTAA-3'
<u><i>SCD1</i></u>		GenBank Accession No. AB075020
<i>SCD1</i> c.878C>T 65,5 °C	outer forward	5'-ACTCACTGAGCCTGTGATCTCTCAATGC-3'
	outer reverse	5'-GGCCACCCAGATGACCCTACTCTTCTAT-3'
	inner forward	5'-AATATTCTGGTTTCCCTGGGAGCGGT-3'
	inner reverse	5'-GTCTTGCTGTGGACTGCTGACTTACACG-3'
<u><i>TG</i></u>		GenBank Accession No. M35823
<i>TG</i> c.-537C>T 58,0 °C	forward	5'-GGGGATGACTACGAGTATGACTG-3'
	reverse	5'-GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGTA-3'

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dr. Manfred Schuster, Dr. Johannes Buitkamp und Dr. Kay-Uwe Götz danke ich für die Überlassung des interessanten und vielseitigen Themas, sowie für die Betreuung der Dissertation an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft. Ihre fachliche Unterstützung, die stete Bereitschaft zu Diskussionen und die Möglichkeit zur freien Entfaltung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Bernd Luckas für die wissenschaftliche Betreuung der Dissertation. Ich danke ihm für seine stets gewährte Unterstützung und die Anregungen bei der Fertigstellung des Manuskriptes.

Allen Kolleginnen und Kollegen im Zentrallabor Grub möchte ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre danken, insbesondere Hilde Krupp, Sabine Oppelt, Claudia Reinhard und Gitti Thalmeier für die tatkräftige Unterstützung im Fleischlabor, Gerhard Zach für seine Hilfe bei der Gaschromatographie und Jödis Semmer für die Isolation der DNA und die geduldige Einweisung in die molekulargenetischen Techniken.

Georg Fleischmann, Charlie Geiger, Maximilian Pickl, Dirk Reinhardt und Josef Rieder danke ich für die anschauliche Erläuterung der Prüfabläufe an der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft und die stete Hilfsbereitschaft bei der Klärung meiner Fragen.

Ich bedanke mich bei Dr. Jörg Dodenhoff und Uli Geuder für die Schätzungen der Varianzkomponenten und Zuchtwerte, sowie für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Daten.

Allen Mitstreitern im QuaLIPID-Projekt danke ich für die gute Zusammenarbeit und die anregenden Diskussionen nicht nur im Rahmen der Projekttreffen. Vielen Dank dem BMBF für die Finanzierung dieses Projektes (FKZ 0313391).

Der größte Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden. Ohne ihren Beistand, ihr Vertrauen, ihre Geduld und Motivation wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit gebe ich mein Ehrenwort, dass mir die geltende Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich erkläre, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Es wurden keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen. Alle verwendeten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit angegeben.

Sofern ich durch Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Anfertigung des Manuskripts unterstützt wurde, sind diese in der Arbeit aufgeführt.

Ich erkläre, dass die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht.

Mit der vorliegenden Arbeit habe ich mich an keiner anderen Hochschule um den akademischen Grad *doctor rerum naturalium* (Dr. rer. nat.) beworben. Ich habe weder früher noch gegenwärtig die Eröffnung eines Verfahrens zum Erwerb des o.g. akademischen Grades an einer anderen Hochschule beantragt.

Susanne Kämmerer

Seefeld, 23.08.2009